

Einfluss von unterschiedlichen Haltungsformen auf die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Huhn

von Julia Angelika Boss

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Einfluss von unterschiedlichen Haltungsformen auf die Entwicklung der
intestinalen Mikrobiota beim Huhn**

von Julia Angelika Boss
aus Backnang

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Institut für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Entwicklung des intestinalen Mikrobioms beim Haushuhn.....	3
1.1	Exogene und endogene Einflüsse auf die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms	3
1.1.1	Maternales Mikrobiom und Umweltfaktoren	3
1.1.2	Entwicklung ökologischer Nischen	5
1.1.3	Organische Säuren im Gastrointestinaltrakt	7
1.1.4	Eigenschaften der Mikroorganismen	8
1.1.5	Kommunikationssysteme	9
1.1.6	Wirtseigene Faktoren	10
1.2	Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms	11
1.2.1	Intestinales Mikrobiom beim Jungtier	11
1.2.2	Intestinales Mikrobiom beim Adulten	15
2	Einflüsse der intestinalen Mikrobiota auf den Wirtsorganismus	18
2.1	Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die Reifung des Immunsystems	18
2.2	Nutritive Einflüsse	20
2.3	Barrierefunktion/ Competitive Exclusion	21
3	Auswirkungen von Antibiotika auf die intestinalen Mikrobiota	24
III	MATERIAL UND METHODEN.....	28
1	Material	28
1.1	Materialien zur Probengewinnung	28
1.2	Materialien für die mikrobiologisch-kulturellen Untersuchungen	28
1.2.1	Geräte	28
1.2.2	Gebrauchsmaterialien	29
1.2.3	Verbrauchsmaterialien	30
1.2.4	Feste Nährmedien	31
1.2.5	Flüssige Nährmedien	32
1.2.6	Lösungen	33
1.2.7	Reagenzien	34
1.2.8	Weitere Chemikalien und Zusätze	35

1.2.9	Software.....	35
1.2.10	Zellkultur	36
1.2.11	Referenzstämme	36
1.3	Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen	36
1.3.1	Geräte	36
1.3.2	Gebrauchsmaterialien	37
1.3.3	Verbrauchsmaterialien.....	38
1.3.4	Chemikalien und Enzyme.....	39
1.3.5	Medien und Lösungen	40
1.3.6	Kits zur DNA-Extraktion und Aufreinigung	42
1.3.7	Primer	42
1.3.8	Referenzstämme	42
1.3.9	Software.....	43
2	Methoden.....	44
2.1	Überblick über den Untersuchungsgang	44
2.1.1	Gruppen 1-3: Küken aus Volieren-, Käfig-, und Maststallhaltung	45
2.1.2	Gruppe 4: Wildvögel im natürlichen Habitat	46
2.2	Versuchsansatz	47
2.2.1	Gruppe 1 und 2: Tiere aus Volieren- und Käfighaltung (Versuch 1).....	47
2.2.2	Gruppe 3: Tiere aus Maststallhaltung (Versuch 2).....	49
2.2.3	Gruppe 4: Wildvögel (Versuch 3)	49
2.3	Tierschutzrecht	49
2.4	Probenbehandlung	50
2.4.1	Tiere aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung	50
2.4.2	Proben aus der Umwelt der Tiere	51
2.4.3	Wildvögel	53
2.5	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchungen	53
2.5.1	Tiere aus Volieren-, Käfig-, und Maststallhaltung.....	53
2.5.2	Proben aus der Umwelt der Tiere	60
2.5.3	Wildvögel	61
2.6	Molekularbiologische Untersuchungen.....	61
2.6.1	Polymerase-Chain-Reaction-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (PCR-SSCP)	61
2.6.2	DNA-Sequenzierung	71

2.7	Vorgehen zur Auswahl potentieller Inokulumstämme.....	71
2.7.1	Kriterien zur Auswahl potentieller Inokulumstämme	71
2.7.2	Prüfung der Antibiotikaresistenz.....	72
2.7.3	Prüfung der Zytotoxizität	72
2.7.4	Typisierung mittels RAPD-PCR	75
2.7.5	Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität gegen Pathogene.....	77
2.7.6	Untersuchung auf Keimkonkurrenz-Eigenschaften	78
IV	ERGEBNISSE	81
1	Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Tieren aus unterschiedlichen Haltungsformen.....	81
1.1	Keimzahlen.....	81
1.1.1	Tiere aus Volieren- und Käfighaltung.....	81
1.1.2	Tiere aus Maststallhaltung.....	88
1.1.3	Keimzahlen in Proben aus der Umwelt der Tiere	90
1.2	Qualitative Zusammensetzung	92
1.2.1	Tiere aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung.....	92
1.2.2	Proben aus der Umwelt der Tiere.....	96
1.2.3	Wildvögel	97
1.3	Phänotypische Resistenz ausgewählter Bakterien.....	98
1.3.1	Indikatorspezies <i>E. coli</i>	98
1.3.2	Indikatorspezies <i>Enterococcus</i> spp.	101
1.4	PCR-SSCP-Analyse des Mikrobioms von Tieren aus unterschiedlichen Haltungsformen	106
1.4.1	Tiere aus Volierenhaltung	106
1.4.2	Proben aus der Umwelt von Tieren aus Volierenhaltung.....	113
1.4.3	Tiere aus Käfighaltung	114
1.4.4	Tiere aus Maststallhaltung.....	116
1.4.5	Vergleich der Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen Tiergruppen mittels UPGMA-Analyse	122
1.4.6	Wildvögel	124
2	Auswahl potentieller Inokulumstämme	127
2.1	Prüfung der phänotypischen Resistenz.....	127
2.2	Prüfung von Effekten auf Stoffwechselfparameter von Zellen	127
2.3	Typisierung mittels RAPD-PCR	129

2.4	Antimikrobielle Aktivität gegen Pathogene	130
2.5	Untersuchung auf Keimkonkurrenz-Eigenschaften	130
2.5.1	Keimkonkurrenz-Versuch 1	131
2.5.2	Keimkonkurrenz-Versuch 2	139
V	DISKUSSION	140
1	Untersuchungsmaterial	140
2	Einordnung der Ergebnisse mikrobiologisch-kultureller Untersuchungen	142
2.1	Quantitative und qualitative mikrobiologisch-kulturelle Untersuchungen	142
2.2	Phänotypische Antibiotikaresistenzraten	147
3	Einordnung der Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen	148
4	Immunologische Befunde	153
5	Auswahl potentieller Inokulumstämme	154
5.1	Kriterien zur Auswahl potentieller Inokulumstämme	154
5.2	Antibiotikaresistenzen	156
5.3	Zytotoxizität	157
5.4	RAPD-PCR	158
5.5	Antimikrobielle Aktivität	158
5.6	Keimkonkurrenz-Eigenschaften	159
6	Schlussfolgerungen und Ausblick	160
VI	ZUSAMMENFASSUNG	162
VII	SUMMARY	164
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	166
IX	ANHANG	192
1	Erweiterte Ergebnisse	192
1.1	PCR-SSCP-Analyse	192
1.1.1	Tiere aus Volierenhaltung	192
1.1.2	Küken aus Käfighaltung	194
1.1.3	Küken aus Maststallhaltung	197

1.2	Sequenzierung	199
1.3	Keimkonkurrenz-Versuch 1	206
1.3.1	<i>Ent. mundtii</i> D 247 799 Ent4 versus <i>Salmonella</i> spp.	206
1.3.2	<i>Ent. mundtii</i> D 247 800 Ent1 versus <i>Salmonella</i> spp.	210
X	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	214
XI	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	218
XII	TABELLENVERZEICHNIS	225
XIII	DANKSAGUNG	227

I EINLEITUNG

Alle Lebewesen eines Ökosystems haben in ihrer Evolution komplexe Wechselbeziehungen symbiotischer, synergistischer, aber auch parasitärer Art aufgebaut. Unsere Haus- und Nutztiere, wie auch der Mensch, gehören vielfältigen Ökosystemen an und müssen sich von ihrer Geburt bis zum Tode mit ihrer belebten Umwelt, insbesondere mit den darin vorkommenden Kleinstlebewesen, auseinandersetzen. Diese Auseinandersetzung kann nützlich, schädlich oder ohne Folgen ablaufen (Mayr, 2007). Die meisten natürlichen Umgebungen beherbergen eine vielfältige Ansammlung von Mikroorganismen. Innerhalb dieser Gemeinschaften kämpfen benachbarte Bakterien um Platz und Ressourcen (Hibbing *et al.*, 2010). So stellt auch der Magen-Darmtrakt des Geflügels ein komplexes Ökosystem dar, welches von einer diversen und hoch entwickelten bakteriellen Gemeinschaft bevölkert wird, die hunderte unterschiedlicher Bakterienspezies umfasst (Stanley *et al.*, 2014).

Welche Mikroorganismen den nahezu unbesiedelten Gastrointestinaltrakt eines frisch geschlüpften Kükens kolonisieren, wird zum einen durch wirtseigene Faktoren, Eigenschaften der Keime und die dem Wirt zugeführten Nährstoffe beeinflusst, zum anderen prägt die direkte Umwelt des Jungtieres die Entwicklung seiner intestinalen Mikrobiota erheblich (Yin *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2014).

Dies bleibt nicht ohne Folgen, denn die Zusammensetzung seines intestinalen Mikrobioms, welches als essentielles „Organ“ betrachtet wird, hat einen bedeutenden Einfluss auf den Wirt (O'Hara & Shanahan, 2006). Diese Zusammenhänge sind noch bei weitem nicht in ihrer gesamten Dimension erfasst (Ursell *et al.*, 2014). Neben zahlreichen weiteren Funktionen ist die Entwicklung der physiologischen Darmmikrobiota bedeutend für die Reifung des Darm-assoziierten und systemischen Immunsystems (Chung *et al.*, 2012); sie bildet zudem über das Prinzip der „competitive exclusion“ eine Barriere gegen unerwünschte pathogene Keime, die den Wirt durch ihre Anwesenheit im Darm erheblich schädigen können (Nurmi & Rantala, 1973).

Die moderne Geflügelproduktion verhindert auf mehreren Ebenen die natürliche, physiologische Besiedlung des Darms und fördert so problematische Keimbesiedlungen (Crhanova *et al.*, 2011), die dann u. a. durch den Einsatz von

Antibiotika kontrolliert werden müssen. Gleichzeitig ist die starke weltweite Zunahme der Antibiotikaresistenz von Bakterien zu einer stetig wachsenden, globalen Gesundheitsgefahr geworden (WHO, 2014).

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, die Entwicklung des physiologischen intestinalen Mikrobioms des Huhns mit klassischen und molekularen bakteriologischen Methoden zu analysieren. Aus der autochthonen Mikrobiota wurden potentiell protektive Vertreter näher charakterisiert und ihre inhibitorischen Effekte als Mono-Spezies gegenüber pathogenen/resistenten Keimen *in vitro* erfasst. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können in der Zukunft dazu dienen, eine definierte Gruppe von physiologischen Bakterien mit synergistischen, nützlichen Eigenschaften zusammen zustellen. Diese können langfristig möglicherweise in der Geflügelwirtschaft zur Verbesserung der Tiergesundheit eingesetzt werden und so eine natürliche Alternative zur Reduktion des Antibiotikaeinsatzes in der Kükenmast darstellen.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Entwicklung des intestinalen Mikrobioms beim Haushuhn

Der Begriff „Mikrobiom“ umfasst nach Blaut und Loh (2009) sämtliche, in einer mikrobiellen Population vorhandenen genetischen Informationen und repräsentiert zugleich das gesamte Stoffwechsellpotential solcher Gemeinschaften. Der Darm von Tier und Mensch wird von Lebewesen aus allen drei Domänen der biologischen Systematik besiedelt: Bakterien, Archaeen und Eukaryoten. Dabei stellen Bakterien mit Abstand die größte und wichtigste Gruppe dar (Blaut & Loh, 2009). Daher wird der Begriff des intestinalen Mikrobioms häufig – wie auch im Folgenden – gleichbedeutend für die bakterielle Gemeinschaft im Darm verwendet.

1.1 Exogene und endogene Einflüsse auf die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms

1.1.1 Maternales Mikrobiom und Umweltfaktoren

Der Schlupf des Vogels unterscheidet sich erheblich vom Geburtsvorgang des Säugers, doch unter natürlichen Bedingungen ist beiden Jungtieren der unmittelbare Kontakt zu den maternalen Mikrobiota gemeinsam.

Säugetiere nehmen schon beim Geburtsvorgang Bakterien der Vaginalschleimhaut sowie der Fäkalflora des Elterntiers auf (Favier *et al.*, 2003; Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Auch eine direkte Übertragung von maternalen Keimen auf den Fetus bereits im Mutterleib mit nachfolgender bakterieller Besiedlung des neonatalen Intestinaltrakts wird diskutiert (Jimenez *et al.*, 2008). Nach der Geburt folgt eine Phase des intensiven Kontaktes zur Mutter, in der das Jungtier – beispielsweise während des Saugaktes – weitere maternale Mikroorganismen empfängt (Heine *et al.*, 1998; Harmsen *et al.*, 2000).

Das Küken hingegen tritt zunächst während des Schlüpfens mit Bakterien auf der Eioberfläche in Kontakt. Anschließend bewegt es sich in der Nähe der Glucke und nimmt durch Bepicken seiner unmittelbaren Umgebung Mikroorganismen auf, welche zum Großteil von den Elterntieren stammen (Fuller, 1984). Diese Keime kolonisieren nun den zuvor nahezu unbesiedelten Verdauungstrakt des Jungtieres

(Smith, 1965; Fuller, 1984; Stanley *et al.*, 2013). Auf diesem Weg erfolgt die physiologische Erstbesiedlung des juvenilen Magen-Darmtrakts vornehmlich durch die autochthone Mikrobiota gesunder, adulter Artgenossen, wodurch das frisch geschlüpfte Küken einen frühen Schutz gegen Pathogene erwirbt (Rantala & Nurmi, 1973).

Anders stellt sich die Situation in der modernen Geflügelproduktion dar, die hohe Hygienestandards verfolgt um potentielle Krankheitserreger auszuschließen: Hier werden die Küken bereits vor dem Schlupf von der Henne getrennt, schlüpfen in der keimarmen Umgebung des Brutschrankes aus gewaschenen und desinfizierten Eiern und werden anschließend in gereinigten und desinfizierten Ställen aufgestellt. In dieser Haltungsform entfällt der Kontakt zu den Elterntieren – und damit auch zu deren physiologischen Mikrobiota – völlig. Stattdessen stammen die ersten Mikroorganismen, mit denen die Küken konfrontiert werden, von Futter, Wasser, Einstreu, Transportboxen und Personal (Fuller, 1984). Der Magen-Darmtrakt der Jungtiere wird folglich von Keimen aus zahlreichen unterschiedlichen Quellen erstbesiedelt, wodurch große Variationen der intestinalen Mikrobiota entstehen (Fuller, 1989; Stanley *et al.*, 2013). Außerdem erfolgt die Kolonisation des Darmes vornehmlich mit solchen Bakterien, die die Desinfektion überstanden haben (Crhanova *et al.*, 2011). Dies mündet zum einen in der verzögerten Entwicklung der intestinalen Mikrobiota der Küken (Methner, 2000), zum anderen wird die Zusammensetzung des Mikrobioms erheblich verändert. Vergleichbare Verhältnisse wurden für Babys beschrieben, die durch Kaiserschnitt entbunden werden: Bei diesen Kindern entfällt die Inokulation mit physiologischen Keimen, die von der Vaginalschleimhaut der Mutter stammen (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Die Erstbesiedlung des Intestinaltraktes der Neugeborenen erfolgt nun in erster Linie durch Bakterien aus dem Mikrobiom der menschlichen Haut (z. B. durch Staphylokokken) sowie durch nosokomiale Mikroorganismen, die bei Pflegemaßnahmen übertragen werden (Fryklund *et al.*, 1992; Heine *et al.*, 1998; Adlerberth *et al.*, 2006; Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) waren häufiger bei Babys nachzuweisen, die durch Sectio entbunden wurden, als bei Neugeborenen, die auf natürlichem Wege zur Welt kamen (Watson *et al.*, 2006). Gleichzeitig verzögert sich die Besiedlung des Darmtrakts durch Mikroorganismen wie Laktobazillen, Bifidobakterien, *Bacteroides* sowie *E. coli* und damit die

Ausbildung eines physiologischen neonatalen Mikrobioms (Grönlund *et al.*, 1999; Adlerberth *et al.*, 2006).

Die Kolonisierung des Darmes zu einem sehr frühen Lebensabschnitt wird als zufälliger Prozess geschildert, der sich erst nach einigen Wochen stabilisiert und bei dem zu sehr frühen Zeitpunkten sowohl Kommensale als auch Pathogene dieselben Chancen haben, den jungen Darm zu besiedeln (Thompson *et al.*, 2008). Die Metagenomanalysen von Turnbaugh *et al.* (2009) zeigten anhand einer Studie mit Zwillingen und deren Müttern, dass Familienmitglieder weniger interpersonelle Variationen im Mikrobiom aufweisen, allerdings war die Ähnlichkeit im Mikrobiom zwischen eineiigen Geschwistern nicht grösser als die bei zweieiigen Zwillingen. Dies legt den Schluss nahe, dass insbesondere Umweltfaktoren, die zu einem sehr frühen Lebensabschnitt auf ein Individuum einwirken, erheblichen Einfluss auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota ausüben (Turnbaugh *et al.*, 2009). Dies deckt sich mit Beobachtung zur Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Huhn, auch hier üben Umweltfaktoren immensen Einfluss aus (Yin *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2013).

1.1.2 Entwicklung ökologischer Nischen

Ähnlich wie beim neugeborenen Säugetier gleichen sich kurz nach dem Schlupf des Kükens die Umweltbedingungen in den einzelnen Darmabschnitten über seinen gesamten Gastrointestinaltrakt; vor allem in Kropf, Duodenum und Ileum herrschen bis zum etwa 4. Lebenstag noch sehr ähnliche Bedingungen. Auch die bakteriellen Gemeinschaften der Kompartimente gleichen sich (van der Wielen *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003). Zudem hat sich anfangs noch keine schützende Mikrobiom im Kropf etabliert und die pH-Werte in Kropf- und Drüsenmagen sind relativ hoch, wodurch die bakterielle Kolonisierung erleichtert wird (Smith, 1965; Üffing, 2012). In diesem Zeitraum siedeln sich vornehmlich aerobe oder fakultativ anaerobe Keime wie Streptokokken / Enterokokken und Coliforme an (Lev & Briggs, 1956; Mead & Adams, 1975). Aufgrund von Stoffwechsellätigkeiten dieser Erstbesiedler wird die Sauerstoffkonzentration im Dickdarm des Jungtieres vermindert und das Redox-Potential abgesenkt, somit dienen die zuerst kolonisierenden Keimspezies als Milieubereiter für die nachfolgend siedelnden Anaerobier (Schulze *et al.*, 2008).

Der Stoffwechsel des frisch geschlüpften Vogels wird zunächst durch den fettreichen Dottersack, der kurz vor dem Schlüpfen vom Embryo über den Nabel eingezogen wird, aufrechterhalten. In den ersten Tagen nach dem Schlupf muss nun die Umstellung auf exogenes, kohlenhydratreiches Futter erfolgen (Noy *et al.*, 2001). Infolgedessen kommt es zu forciertem Wachstum und gesteigerter Stoffwechselaktivität des Gastrointestinaltraktes, insbesondere des Dünndarms (Uni *et al.*, 1998; Sklan, 2001). Neben der Sauerstoffverfügbarkeit ändern sich nun auch andere Faktoren wie der pH-Wert, die Anwesenheit von Gallensalzen, und das Angebot an Nährstoffen in den einzelnen Kompartimenten, die sich dadurch wiederum zu separaten Nischen für unterschiedliche Mikroorganismen entwickeln (van der Wielen *et al.*, 2002). Zudem variieren die Glycokonjugate an der Oberfläche des Darmepithels in den einzelnen intestinalen Segmenten beim Huhn wie auch beim Säuger (Alroy *et al.*, 1989). Dies spiegelt sich in der deutlich unterschiedlichen Zusammensetzung des Mikrobioms in den einzelnen Darmabschnitten wider; lediglich die beiden Zäka weisen diesbezüglich hohe Übereinstimmungen auf (van der Wielen *et al.*, 2002). Letztendlich kann jedes Darmkompartiment als eigenes Ökosystem betrachtet werden (Barnes *et al.*, 1972; Apajalahti *et al.*, 1998, van der Wielen *et al.*, 2002), eine Beobachtung die auch auf den Gastrointestinaltrakt anderer Tierarten und auf den des Menschen zutrifft (Simpson *et al.*, 2000; Eckburg *et al.*, 2005; Costello *et al.*, 2009). Kropf und Muskelmagen weisen wegen der dort niedrigen pH-Werte, sowie aufgrund der im Magen anwesenden Enzyme ein geringeres Keimspektrum auf (Fuller, 1984; Gabriel *et al.*, 2006). Hingegen zeigt die mikrobielle Zusammensetzung in den Zäka die größte Vielfalt (Ni *et al.*, 2008). Dies wird unter anderem der langsameren Durchflussrate des sich nur bei etwa jeder 7. Defäkation entleerenden dickbreiigen Zäkuminhaltes, im Vergleich zum flüssigen Inhalt des Duodenums zugeschrieben (Smith, 1965; Heider & Monreal, 1992). Außerdem herrscht in den kranialen Abschnitten des Dünndarmes ein niedrigerer pH-Wert und das Milieu wird durch die Anwesenheit von Pankreas- und Gallensekreten beeinflusst (Rehman *et al.*, 2007). Die mikrobielle Gemeinschaft von Kloake und Rektum hängt schließlich davon ab, ob sich in diesem Abschnitt zum betreffenden Zeitpunkt Material aus dem Dünndarm oder aus den sich zwei- bis viermal täglich entleerenden Blinddärmen befindet (Barrow, 1992).

Die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota des Broilers wird auch durch das Futter beeinflusst (Apajalahti *et al.*, 2001; Apajalahti *et al.*, 2004). Dabei haben sowohl die Getreideart als auch der Vermahlungsgrad des Getreides einen unmittelbaren Einfluss auf die Mikroorganismen (Üffing, 2012), außerdem spielt die Fütterungsfrequenz eine Rolle (Hinton *et al.*, 2000). Zudem können Futterzusätze wie z. B. Probiotika oder Präbiotika die Bakterienpopulation im Darmtrakt der Hühner beeinflussen (Xu *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2014). So reflektiert die mikrobielle Gemeinschaft des Gastrointestinaltraktes auch die Koevolution von Mikroorganismen mit ihrem Wirt und den ihm zugeführten Nährstoffen (Drasar & Barrow, 1985).

Die bakterielle Gemeinschaft im Darm wird mit zunehmendem Alter der Tiere deutlich komplexer (Barnes *et al.*, 1972; van der Wielen *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003).

1.1.3 Organische Säuren im Gastrointestinaltrakt

Beim bakteriellen Abbau von Kohlenhydraten entstehen organische Säuren (Barnes *et al.*, 1980b). Ihre Zusammensetzung hängt von den jeweiligen Mikrobiota ab. So erzeugen z. B. Laktobazillen Laktat (Kandler, 1983), obligat anaerobe Mikroorganismen bilden Acetat, Propionat und Butyrat (van der Wielen *et al.*, 2000). Die vorderen Darmabschnitte (vom Kropf bis zum terminalen Ileum) werden in erster Linie durch *Lactobacillus* spp. besiedelt, während die beiden Zäka vor allem fakultative und obligate Anaerobier beherbergen, wobei letztere dominieren (Lev & Briggs, 1956; Mead & Adams, 1975; Fuller, 1984; Lu *et al.*, 2003). Somit herrscht beispielsweise Laktat im Kropf vor, während im Zäkum Acetat dominiert und von Laktat, Propionat und Butyrat begleitet wird (Moore *et al.*, 1969). Die kurzkettigen Fettsäuren unterstützen zum einen den Energiehaushalt von Enterozyten (Nava *et al.*, 2005) und stimulieren das Wachstum der Epithelzellen (Kripke *et al.*, 1989), zum anderen bewirken sie – vor ihrer Resorption – eine kurzfristige Absenkung des lokalen pH-Wertes im Darmlumen mit der Folge eines leicht sauren Milieus im Dickdarm, welches die Ausbildung einer acidophilen Flora nach sich zieht (Schulze *et al.*, 2008). So gestalten diese Verbindungen nun wiederum das umgebende Milieu mit und üben Einfluss auf die intestinalen Mikrobiota aus (Lee & Gemmell, 1972; van der Wielen *et al.*, 2000); auch ein hemmender Effekt auf die Ansiedlung

darmpathogener Keime bzw. auf Keime mit zoonotischen Potential wird ihnen von einigen Autoren zugesprochen (Barnes *et al.*, 1980a; Kubena *et al.*, 2001).

1.1.4 Eigenschaften der Mikroorganismen

Weitere Eigenschaften der Bakterien selbst wie beispielsweise ihre Beweglichkeit, die Fähigkeit zur Sporenbildung, ihre Säuretoleranz, die Expression von Resistenzgenen oder die Produktion antimikrobieller Verbindungen wie Antibiotika und Bakteriozine beeinflussen die Zusammensetzung und Diversität des Keimspektrums von Ökosystemen (Fuller, 1984; Czarán *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2002; Reichenbach *et al.*, 2007). Zudem können niedermolekulare Substanzen aus dem Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel von Bakterien bakterizide und/oder bakteriostatische Wirkung auf ein breites Spektrum von Mikroorganismen entfalten. Hierzu zählen u. a. organische Säuren, Wasserstoffperoxid und Diacetyl; wobei letzteres z. B. von Milchsäurebakterien gebildet wird und vor allem gramnegative Bakterien in ihrem Wachstum beeinflusst (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

Für die Besiedlung des Magen-Darmtraktes spielt es zudem eine entscheidende Rolle, ob ein Bakterium in der Lage ist, an Strukturen des Wirtsorganismus zu adhären (Fuller, 1984). Auf diese Weise entgehen die Keime der Ausscheidung durch die Darmperistaltik, zudem bietet die Kolonisation der Mukusschicht einen Wachstumsvorteil, da so deren Glycoproteine als direkte Kohlenhydrat- und Proteinquelle genutzt werden können und exogene Nährstoffe wie Vitamine und Mineralien im Mukus konzentriert vorliegen (Deplancke & Gaskins, 2001). Das „Anhaften“ der Bakterien an das Darmepithel bzw. an die dem Darm lumenseitig aufliegende Muzinschicht wird über bakterielle Adhäsine vermittelt, die Zuckermoleküle auf der Oberfläche von Wirtszellen erkennen und an diese binden. Zu den Adhäsinen gehören zum einen Fimbrien, filamentöse, unbewegliche Anhänge aus Protein (Pilin), die als starre Gebilde oder in gewundener lockiger Form von der Bakterienoberfläche ausgehen (Krüger & Seidler, 2007). Zum anderen kann die Adhäsion auch durch Oberflächenproteine (nicht-Fimbrien-Adhäsine) wie Matrixprotein-bindende Proteine (sogenannte MSCRAMMs) vermittelt werden, beide Typen kommen sowohl in grampositiven als auch gramnegativen Bakterien vor (Valentin-Weigand, 2010). Die Bindung ist spezifisch, reversibel und kann in einigen Fällen durch Signaltransduktion auch zu weiteren Reaktionen der Bakterien und/oder der Wirtszelle führen. Im

Unterschied zu pathogenen Bakterien führt die Haftung apathogener Darmbewohner im physiologischen Zustand zu keiner Abwehrreaktion (sie werden toleriert), außerdem sind physiologisch vorkommende Keime nicht invasiv oder schädigen den Wirt durch Toxinbildung (Schulze *et al.*, 2008). Die apathogene Standortflora konkurriert oft mit pathogenen Bakterien um Anheftungsstellen und trägt dadurch erheblich zum Schutz des Wirtes vor Infektionserregern bei (Valentin-Weigand, 2010; Sengupta *et al.*, 2013).

1.1.5 Kommunikationssysteme

Mikroorganismen haben zahlreiche Adaptionsmechanismen entwickelt, die ihnen helfen, ihre Umwelt zu erfassen und z. B. auf Temperaturschwankungen, Nährstoffversorgung, pH-Wert, Wasser- sowie Sauerstoffgehalt zu reagieren. So wird z. B. über Nährstofflimitierung die Versporung mancher Bakterien ausgelöst (Nicholson *et al.*, 2000). Die Fähigkeit zur Interaktion mit und Anpassung an ihre lokale Umwelt entscheidet auch darüber, ob eine bestimmte Bakterienpopulation in einem Habitat – wie dem Gastrointestinaltrakt – überlebt oder verdrängt wird (Krüger & Seidler, 2007). Durch Mutation und Selektion können außerdem „neue“, an eine bestimmte Nische besser angepasste Bakterienpopulationen entstehen (Kassen & Rainey, 2004; Reichenbach *et al.*, 2007).

In ihrem jeweiligen Habitat, z. B. im Dickdarm, befinden sich die dort lebenden Mikroorganismen auch untereinander in einem ständigen Informationsaustausch, der als „Quorum sensing“ bezeichnet wird (Waters & Bassler, 2005; Keller & Surette, 2006). Hierbei bilden die Zellen einer Bakterienpopulation kontinuierlich kleine Signalmoleküle, die auch als Autoinducer bezeichnet werden und ein großes Spektrum aus Stoffklassen und Stofftypen umfassen (Krüger & Seidler, 2007). Über deren Konzentration in der Umwelt kann von anderen Mitgliedern die Zelldichte oder das „Quorum“ einer Population festgestellt werden. Steigt die Konzentration der Autoinducer über einen bestimmten Grenzwert, wird eine Signalkaskade in den Bakterien initiiert welche zu Veränderungen in der Genexpression führt, wodurch die Population ihren Phänotyp z. B. über die Produktion von Enzymen, Toxinen, Antibiotika oder durch die konjugative Übertragung von Plasmiden anpasst (Krüger & Seidler, 2007). Die meisten von diesem System gesteuerten Prozesse wären bei Einzelkeimen ineffizient, doch für ihre Population dienen sie u .a. zur Erschließung neuer Habitate, zur Abwehr von Antagonisten, zur Übertragung von genetischem Material (Hibbing *et al.*, 2010).

Dabei existiert sowohl Spezies-spezifisches als auch Spezies-unspezifisches Quorum sensing. Spezies-unspezifisches Quorum sensing kann einerseits zu synergistischem Agieren von Bakterien in einer Mischkultur führen, andererseits besteht die Möglichkeit durch Interspezies-Quorum sensing auf wachsende Zahlen von Konkurrenten zu reagieren (Waters & Bassler, 2005; Keller & Surette, 2006).

Mitglieder der physiologischen Darmflora sind außerdem in der Lage, nicht nur untereinander, sondern auch mit dem Darmepithel und dem dahinter liegenden darmassoziierten Immunsystem über den Austausch von Signalmolekülen zu kommunizieren (Artis, 2008; Cheesman & Guillemin, 2007; Clavel & Haller, 2007; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004); dadurch kann die Expression von Genen des Wirtes beeinflusst werden, was wiederum Auswirkungen auf die Darmfunktion nach sich zieht (Hooper & Gordon, 2001). Ein solcher „Crosstalk“ findet beispielsweise zwischen *Bacteroides thetaiotaomicron* und den Darmepithelzellen seines Wirtes statt (Bry *et al.*, 1996; Hooper *et al.*, 1999; Hooper *et al.*, 2001).

1.1.6 Wirtseigene Faktoren

Auch wirtseigene Faktoren beeinflussen die intestinalen Mikrobiota (van der Wielen *et al.*, 2002), wobei Genotyp und Geschlecht des Wirtes sowie seine immunologischen Eigenschaften und weitere Kommunikationssysteme zwischen Wirt und Bakterium eine Rolle spielen (Zoetendal *et al.*, 1998; Schulze *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013).

Der Wirtsorganismus wirkt unter anderem über die Sekretion von Hormonen oder anderen Signalmolekülen auf die Mikroorganismen im Darm ein: so konnte beispielsweise für den Menschen gezeigt werden, dass ein unter exokrinem Stress stark erhöhter Cortisolspiegel zu einer nachfolgend signifikanten Veränderung im Spektrum der Darmkeime führt (Meng *et al.*, 1984). Des Weiteren wirkt sich Stress auf die intestinale Peristaltik und die Bildung von Verdauungssekreten aus (AWT, 1999). Sowohl chronische als auch akute Belastungen können einen Effekt auf das intestinale Mikrobiom haben (Eutamene & Bueno, 2007). So reagieren auch die Mikrobiota des Geflügels auf Stress (Hume *et al.*, 2003); dieser kann beispielsweise durch exogene Faktoren wie beim Transport oder durch hohe Besatzdichten ausgelöst werden, aber auch infolge des schnellen Wachstums von Masthybriden entstehen (Hume *et al.*, 2003; Burkholder *et al.*, 2008).

1.2 Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms

1.2.1 Intestinales Mikrobiom beim Jungtier

Auch aus den unter Punkt 1.1 dargestellten Gründen stellt die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms einen dynamischen Prozess dar, bei dem die Zusammensetzung der Mikrobiota - auf dem Weg ihrer Etablierung zu einem stabilen Ökosystem - erheblichen Schwankungen unterliegt (Lu *et al.*, 2003). Betrachtet man Studien über den zeitlichen Ablauf der Besiedlung des Gastrointestinaltraktes von Küken können folgende Beobachtungen gemacht werden:

Mit Hilfe kultureller Anzuchtmethoden wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass die physiologische Besiedlung des Gastrointestinaltrakts von Küken mit dem Anpicken der Kalkschale des schlupfbereiten Embryos beginnt; bereits wenige Stunden nach dem Schlupf sind somit bereits Bakterien im Darm der Jungtiere nachweisbar, wenn auch noch in geringer Anzahl (Smith, 1965; Gerlach, 1994).

Der Prozess der Etablierung des intestinalen Mikrobioms variiert in Abhängigkeit von Haltungs- und Fütterungsbedingungen und benötigt im Dünndarm eine Zeit von etwa 2 Wochen, während bis zum Abschluss der Mikrobiotaentwicklung im Zäkum mehr als 4-6 Wochen erforderlich sein können (Barnes *et al.*, 1972; Barnes *et al.*, 1980). Einzelne Bakteriengruppen wandern zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den Gastrointestinaltrakt der Tiere ein und erreichen hier recht rasch hohe Keimzahlen, welche sich schließlich auf ein relativ konstantes Niveau einpendeln (Gerlach, 1994). Dabei können die Gesamtkeimzahlen von Bakteriengruppen auch in den weiter kaudal gelegenen Abschnitten des Verdauungsapparates (z. B. Enterokokken im Zäkum) nach einigen Wochen wieder leicht abnehmen (Shapiro & Sarles, 1949). Anhand klassischer bakteriologischer Untersuchungen wurde außerdem beobachtet, dass vor der ersten Futteraufnahme sowie in den ersten 2-4 Lebenstagen der Tiere vornehmlich Streptokokken/Enterokokken und Enterobacteriaceae den Dünndarm und das Zäkum kolonisieren; des Weiteren konnten Clostridien im Darmtrakt frischgeschlüpfter Küken nachgewiesen werden (Smith, 1965; Barnes *et al.*, 1972). Die Keimzahlen schwanken dabei sehr und liegen nach 12-36 h zwischen 10^3 - 10^9 /g Darminhalt (Gerlach, 1994). Laktobazillen besiedeln den Gastrointestinaltrakt langsamer und sind nach ca. 2-4 Tagen sowohl im Dünndarm

als auch im Dickdarm in höheren Konzentrationen stabil nachweisbar (Smith, 1965; Barnes *et al.*, 1972; Mead & Adams, 1975). Mit dem Auftreten der obligat anaeroben, nicht sporenbildenden *Bacteroides* ist etwa ab dem 6. Lebenstag der Hühner zu rechnen (Smith, 1965). Während der ersten Lebenswoche erreichen die intestinalen Gesamtkeimzahlen bereits die Größenordnung erwachsener Tiere, die Zusammensetzung des Mikrobioms unterliegt jedoch noch erheblichen Schwankungen (Gerlach, 1994). Zu diesem Zeitpunkt sind Laktobazillen vor allem im Duodenum nachweisbar, sie dominieren die vorderen Darmabschnitte dann etwa ab dem 7. Lebenstag, während in den beiden Zäka nach ca. 2 Wochen obligat anaerobe Mikroorganismen vorherrschen; diese stellen die Mehrheit der zäkalen Mikrobiota während des weiteren Lebens der Hühner dar (Lev & Briggs, 1956; Barnes, 1972; Salanitro *et al.*, 1974; Mead & Adams, 1975). Ab der vierten Lebenswoche werden Keime der *Bacteroides*-Gruppe konstant in hohen Keimzahlen im Blinddarm nachgewiesen (Gerlach, 1994), bis zur 5./6. Lebenswoche erfolgt eine starke qualitative und quantitative Zunahme der zäkalen anaeroben Mikrobiota (Barnes *et al.*, 1972).

Gerlach (1994) fasst die anhand kultureller Studien ermittelten Durchschnittswerte der intestinalen Mikrobiota beim Haushuhn ab der 5. Lebenswoche wie in diesem Abschnitt beschrieben zusammen: Im Duodenum werden nun Keimzahlen von „ 10^2 – $10^{5(7)}$ “/g Darminhalt erreicht, die autochthone Flora der Tiere besteht überwiegend aus Laktobazillen, einem geringen Anteil Streptokokken/Enterokokken und wenigen Enterobacteriaceae. Das mittlere Jejunum beherbergt 10^6 – 10^8 Bakterien/g Darminhalt, wobei auch hier *Lactobacillus* spp. dominieren. Die größte Diversität in der Zusammensetzung seiner Mikroorganismen zeigt das Zäkum. Die intestinalen Mikrobiota erreichen in diesem Kompartiment nach der 5. Lebenswoche Gesamtkeimzahlen von 10^9 – 10^{10} /g Darminhalt und werden vornehmlich durch gramnegative, obligat anaerobe Keime repräsentiert. Laktobazillen stellen im Blinddarm etwa 10 % der Bakterienpopulation, daneben finden sich Streptokokken / Enterokokken (10^6 – 10^7 /g Darminhalt), Enterobacteriaceae (10^5 – 10^8 /g Darminhalt) sowie sehr geringe Anteile an Clostridien und weiteren grampositiven Mikroorganismen (Gerlach, 1994).

Bei der elektronenmikroskopischen Darstellung des Kropfepithels wird deutlich, dass dieses dicht von Laktobazillen bedeckt ist; die Mikroorganismen adhärieren

über wandständige Kohlenhydratgruppen an der Glykokalix des Epithels, zeigen jedoch keine Invasion (Brooker & Fuller, 1975; Savage, 1979). Über ihre Laktatproduktion senken sie den pH-Wert im Kropf, wodurch die Ansiedlung von säureempfindlichen Keimen wie Coliformen und Clostridien in diesem Kompartiment gehemmt wird (Fuller, 1978); einige *Lactobacillus* spp. sind außerdem in der Lage, Bakteriozine zu produzieren (Silva *et al.*, 1987). Diese Proteine entfalten ihre antimikrobielle Wirksamkeit häufig gegenüber nahen Verwandten des produzierenden Bakterienstammes (Green *et al.*, 1997), sind aber teilweise auch in der Lage, grampositive wie gramnegative Mikroorganismen anzugreifen (Ko & Ahn, 2000; Messi *et al.*, 2001; de Kwaadsteniet *et al.*, 2005). Die bereits erwähnte Milchsäure erhöht zudem die Permeabilität der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien (z. B. von *E. coli*) wodurch diese Mikroorganismen sublethal geschädigt werden und weitere antimikrobielle Substanzen, wie z. B. Bakteriozine, leichter ins Zellinnere gramnegativer Mikroorganismen gelangen können (Alakomi *et al.*, 2000).

Apajalahti *et al.* (2004) führten eine Studie zur Heranbildung des intestinalen Mikrobioms beim Huhn mittels kulturunabhängiger Durchflusszytometrie durch und bestätigten, dass die bakterielle Inokulation des Magen-Darm-Traktes und die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota unmittelbar nach dem Schlupf beginnt. In Ileum und Zäkum von Broilern wurden bereits nach 24 h 10^8 – 10^{10} Mikroorganismen/g Darminhalt nachgewiesen. Innerhalb der ersten drei Lebensstage erreichten die Bakterienzellzahlen im Ileum 10^9 /g Darminhalt und stiegen im Zäkum auf 10^{11} /g Darminhalt an, diese Konzentrationen blieben in den nachfolgenden 30 Tage relativ stabil (Apajalahti *et al.*, 2004).

Anhand der DGGE-Technik vollzogen van der Wielen *et al.* (2002) die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Huhn nach. Hierbei konnten sie am ersten Tag nach dem Schlupf lediglich im Kropf der untersuchten Küken vereinzelt Mikroorganismen detektieren, während die Anzahl bakterieller Gene in den anderen Darmabschnitten unter der Nachweisgrenze der angewandten Methode lag. In den folgenden Tagen stieg die Anzahl an Banden in den DGGE-Gelen aller Kompartimente, wobei sich die Bandenprofile der einzelnen Darmabschnitte erst ab dem 4. Lebenstag der Tiere deutlich unterschieden. Bis Tag 11 stieg die Diversität der intestinalen Mikrobiota über den gesamten Gastrointestinaltrakt und zeigte sich in Ileum und Zäkum auch im nachfolgenden

Untersuchungszeitraum vielfältig, die Zahl der Banden im DGGE-Profil von Kropf- und Duodenum unterlag hingegen gewissen Schwankungen. Das Zäkum wies – verglichen mit den anderen intestinalen Kompartimenten – die höchste Diversität der Mikrobiota auf (van der Wielen *et al.*, 2002).

Ebenfalls mit Hilfe molekularbiologischer Methoden untersuchten Lu *et al.* (2003) die Kolonisierung von Ileum und Zäkum frisch geschlüpfter Küken durch Mikroorganismen. In Übereinstimmung zu früheren Studien zeigten auch die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe, dass sich die Erstbesiedlung der Kompartimente innerhalb der ersten drei Lebenstage einheitlich vollzieht und einen transienten Prozess darstellt. Sie legten außerdem nahe, dass sich das zäkale Mikrobiom innerhalb der ersten 14 Lebenstage als eine Teilmenge der ilealen Mikrobiota präsentiert. Später unterschied sich die Zusammensetzung der Mikrobiota in den beiden Kompartimenten signifikant. Im Blinddarm dominierten zu jedem Untersuchungszeitpunkt Clostridiales, sie stellten 50–85 % des zäkalen Mikrobioms, wobei innerhalb dieser Ordnung in erster Linie Sequenzen von *Ruminococcus*, *Clostridium* und *Eubacterium* detektiert werden konnten. Des Weiteren erwiesen sich *Fusobacterium* (14 %), *Lactobacillus* (8 %) und *Bacteroides* (5 %) als Vertreter der zäkalen Mikrobiota. Die Zusammensetzung der Clostridiales unterlag im Untersuchungszeitraum gewissen Schwankungen; so konnten nach 7 Tagen vor allem Sequenzen identifiziert werden, die Verwandten von *Cl. saccharolyticum*, *Cl. oroticum* und *Cl. orbiscindens* zugewiesen wurden. Im Zeitraum von 14-28 Tagen wurden diese von *Ruminococcus schinkii* und *Cl. indolis* abgelöst, während sich nach 29 Tagen Sequenzen von *Eubacterium* spp. im Probenmaterial dominant zeigten. Am 3. Lebenstag der Küken konnte ein Viertel der identifizierten bakteriellen Sequenzen im Zäkum der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet werden, dabei erwiesen sich vor allem *Lactobacillus delbrueckii* und *Lactobacillus acidophilus* präsent. Danach nahm der Anteil an Laktobazillen in diesem Darmabschnitt deutlich ab (auf 1–11 %) und es konnte keine dominanten *Lactobacillus*-Spezies mehr ausgemacht werden. Im Ileum stammte die Mehrzahl an detektierten bakteriellen Genen von Mikroorganismen der Gattung *Lactobacillus* (70 %) weitere Sequenzen stellten Clostridiaceae (11 %), *Streptococcus* (6,5 %) und *Enterococcus* (6,5 %). Innerhalb der Laktobazillen variierten die vorherrschenden Spezies zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten von *Lactobacillus delbrueckii* (Tag 3) über

Lactobacillus acidophilus (zwischen Tag 7 und 21) und *Lactobacillus crispatus* (Tag 28 bis 49) bis hin zu *Lactobacillus salivarius* (Tag 49) (Lu *et al.*, 2003).

Mit Hilfe von bakterienspezifischen Primern konzentrierten sich Amit-Romach *et al.* (2004) bei ihrer Untersuchung der Mikroökologie im Magen-Darmtrakt von Küken auf die 6 Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia* und *Clostridium*, deren Mengenverhältnisse sie in Relation zueinander beschrieben. Folgende Beobachtungen wurden dargelegt: Im Blinddarm machten nach 4 Tagen Laktobazillen ca. 25 % der auf diese Weise detektierten Mikroorganismen aus, während ca. ein Drittel der untersuchten Sequenzen von *E. coli* und *Clostridium* spp. stammten. Die Küken wiesen zu diesem Zeitpunkt eine relativ starke zäkale Besiedlung durch Salmonellen auf: 40 % der identifizierten bakteriellen Gene wurden dieser Gattung zugeordnet.

Nach 14 Tagen zeigten sich nach Angaben der oben genannten Autoren *Salmonella* spp. deutlich reduziert (auf 10 %) und fielen im nachfolgenden Untersuchungszeitraum weiter ab, während *Lactobacillus/Bifidobacterium* nach 2 Wochen 40 % und am 25. Lebenstag der Hühner die Hälfte der untersuchten Bakterienpopulation im Blinddarm repräsentierten. Die Anteile an *E. coli* sowie *Clostridium* spp. zeigten sich relativ stabil und lagen zu jedem dargelegten Zeitpunkt bei ca. 30 %. *Campylobacter* spp. wurden insgesamt nur in geringem Ausmaß nachgewiesen. Im Dünndarm stammte zu jedem Untersuchungszeitpunkt der Großteil der analysierten bakteriellen Gensequenzen von Laktobazillen. Daneben konnten *E. coli* und Clostridien in Jejunum und Ileum der Küken detektiert werden (Amit-Romach *et al.*, 2004).

Während die Besiedlung des Gastrointestinaltraktes beim adulten Individuum unter physiologischen Bedingungen relativ stabil ist, haben insbesondere während der Heranreifung des intestinalen Mikrobioms endogene und exogene Faktoren erheblichen Einfluss auf das Keimspektrum und die Aktivitäten der intestinalen Mikroorganismen (Savage, 1977; Lan *et al.*, 2005; Lu *et al.* 2003) geben zu bedenken, dass sich bei Hühnern selbst unter Langmast kein stabiles Mikrobiom etabliert, da es sich beim schlachtreifen Masthuhn um ein juveniles Tier handelt.

1.2.2 Intestinales Mikrobiom beim Adulten

Savage (1977) unterteilte die Mitglieder der Magen-Darm-Flora in autochthone (residente) und allochthone (transiente) Mikroorganismen. Dabei stammen die

autochthonen Vertreter aus derselben Wirtsspezies, besetzen Nischen im Gastrointestinaltrakt und bilden die Mehrheit im Verdauungskanal erwachsener Tiere, in welchen sie eine dauerhafte, stabile Gemeinschaft darstellen. Zu dieser „Normalflora“ zählen in erster Linie anaerobe Keime, die oft eng mit der Darmwand/dem Mukus assoziiert sind und eine gesundheitsfördernde Wirkung auf den Makroorganismus ausüben (Krüger & Seidler, 2007). Dem gegenüber stehen die allochthonen Bakterien, welche wenig zur Aufrechterhaltung des Ökosystems beitragen. Sie werden aus anderen Quellen in der Umwelt erworben und besiedeln den Darmkanal häufig nur vorübergehend. Diese Mikroorganismen sind zwar innerhalb einer Wirtsspezies meist nur bei wenigen Individuen anzutreffen, können jedoch im Gastrointestinaltrakt des Einzelnen in großer Anzahl vorhanden sein (Savage, 1977).

Des Weiteren kann die Darmflora in Haupt-, Begleit- und Restflora unterteilt werden (Gedek, 1991). Die Hauptflora setzt sich nach Mayr (2007) vornehmlich aus anaeroben, grampositiven Bifidobakterien/Laktobazillen, Bacteroidaceae und Eubakterien zusammen und stellt in der Eubiose mindestens 95 % der Mikroorganismen im Darmtrakt, wohingegen die fakultativ anaerobe Begleitflora in diesem physiologischen Zustand nur 1 % und die Restflora – welche aus Clostridien, Proteus, Staphylokokken, Campylobacter, Pseudomonaden, Hefen und anderen, gelegentlich als Krankheitserreger auftretende Arten besteht – lediglich 0,01 % ausmacht. In der Dysbiose ist die Mikroökologie im Gastrointestinaltrakt gestört und die oben beschriebenen Verhältnisse verschieben sich, wodurch sich die Schutzwirkung der physiologischen Mikrobiota vermindert, was nun wiederum die Ansiedlung pathogener bzw. fakultativ pathogener Keime erleichtert (Mayr, 2007).

Neuere, auf molekularbiologischen Techniken basierende Studien zeigen, dass auch erwachsene, gesunde Individuen untereinander erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms aufweisen (Eckburg *et al.*, 2005; Human Microbiome Project Consortium, 2012). Wodurch diese Unterschiede begründet sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch genetische Faktoren, Umwelt und Ernährung des Wirtes spielen eine Rolle (Human Microbiome Project Consortium, 2012). So stellen Vertreter der Firmicutes und Bacteroidetes 90 % der Bakterien im Dickdarm – die Diversität begründet sich vor allem auf Speziesebene (Thompson *et al.*, 2008). Betrachtet man die genetischen

Informationen der intestinalen Mikroorganismen mithilfe der Metagenomik, wird ein genetischer „Core“ des intestinalen Mikrobioms evident: es zeigt sich, dass die genetische Information der intestinalen Mikrobiota von Genen dominiert wird, welche für Signalwege und Stoffwechselfunktionen codieren (Turnbaugh *et al.*, 2009; Gorkiewicz *et al.*, 2013). Die Genprodukte dienen zur Aufspaltung von Nährstoffen, für deren Abbau dem Wirtsorganismus die entsprechenden Enzyme fehlen (Turnbaugh *et al.*, 2009).

Das intestinale Mikrobiom von adulten Hühnern weist eine große Diversität auf: Apajalahti *et al.* (2004) konnten mit molekularbiologischen Methoden zeigen, dass dieses ca. 640 Arten umfasst, viele davon konnten jedoch noch nicht näher identifiziert werden.

Die vorherrschenden Gattungen in den einzelnen Darmkompartimenten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Dominierende Arten im Gastrointestinaltrakt des Huhnes (Stanley, 2014)

Kompartiment	Dominierende Bakterien	Literatur
Kropf	<i>Lactobacillus</i> spp. (vorherrschend), außerdem Clostridiaceae, <i>Bifidobacterium</i> spp., Enterobacteriaceae, <i>Enterococcus</i> spp.	Sekelja <i>et al.</i> , 2012 Rehman <i>et al.</i> , 2007 Fuller, 1973
Magen	<i>Lactobacillus</i> spp (vorherrschend), daneben Clostridiaceae, <i>Enterococcus</i> spp., Coliforme	Sekelja <i>et al.</i> , 2012 Rehman <i>et al.</i> , 2007 Fuller, 1973
Duodenum	<i>Lactobacillus</i> spp. (bis zu 99 %), daneben <i>Streptococcus</i> / <i>Enterococcus</i> spp., Coliforme	Lu <i>et al.</i> , 2003 Gong <i>et al.</i> , 2002 Salanitro <i>et al.</i> , 1974
Ileum	<i>Lactobacillus</i> spp. (vorherrschend), daneben <i>Streptococcus</i> / <i>Enterococcus</i> spp, Coliforme, Enterobacteriaceae, Clostridiaceae	Lu <i>et al.</i> , 2003 Gong <i>et al.</i> , 2002 Salanitro <i>et al.</i> , 1974
Zäkum	Viele unbekannte/nicht kultivierbare Arten, <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.	Gong <i>et al.</i> , 2002 Lu <i>et al.</i> , 2003 Stanley <i>et al.</i> , 2013
Fäzes	abhängig vom Zeitpunkt: <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Faecalibacterium</i> spp., <i>Ruminococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Eubacterium</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp.	Sekelja <i>et al.</i> , 2012 Zoetendal <i>et al.</i> , 1998

2 Einflüsse der intestinalen Mikrobiota auf den Wirtsorganismus

2.1 Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die Reifung des Immunsystems

Die Entwicklung einer physiologischen Darmmikrobiota ist bedeutend für die Reifung des Darm-assoziierten und systemischen Immunsystems (Chung *et al.*, 2012), wobei insbesondere das GALT (gut associated lymphoid tissue) durch die autochthonen intestinalen Mikroorganismen moduliert und aufrechterhalten wird (Salminen *et al.*, 1998; Clavel & Haller, 2007; Artis, 2008).

Im Vergleich zum Säuger weist das lymphatische Gewebe des Vogels deutliche Unterschiede hinsichtlich seiner Struktur und Verteilung auf. Ein prominentes Beispiel sind die aviären Lymphknoten, welche nur bei Wasser- und Sumpfvögeln als Hals- und Lendenlymphknoten bekannt sind und die erheblich vom Bauprinzip der Säugerlymphknoten abweichen; des Weiteren stellen Bursa fabrizii (Madej *et al.*, 2013), Lymphherzen, murale lymphoretikuläre Formationen sowie die Perlenkettenkonfiguration der Transportgefäße charakteristische Besonderheiten des aviären Immunsystems dar (König *et al.*, 2009). Trotz dieser strukturellen Unterschiede sind sich jedoch die Funktion der lymphatischen Organe und die Mechanismen der Immunabwehr bei Vogel und Säuger prinzipiell sehr ähnlich (Sharma, 1991).

Das GALT des Huhnes besteht – ähnlich wie beim Säugetier - aus organisiertem lymphatischem Gewebe mit Lymphfollikeln, lymphatischen Infiltrationen der Lamina propria und intraepithelialen Lymphozyten (Lillehoj & Trout, 1996; Liebler-Tenorio & Pabst, 2006). Zäkaltonsille, Peyer'sche Plaques, Bursa fabrizii, Meckel'sches Divertikel (ein Rudiment des Dottersacks im Dünndarmbereich) und zahlreiche Lymphaggregate entlang des Gastrointestinaltraktes repräsentieren wiederum das organisierte lymphatische Gewebe des GALT (Befus *et al.*, 1980).

Durch die kommensalen intestinalen Mikrobiota wird auch beim Huhn sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunabwehr stimuliert (Brisbin *et al.*, 2008). Dieser Einfluss unterliegt komplexen Regulationsmechanismen, die dafür sorgen dass keine überschießenden Abwehrreaktionen mit nachfolgender Darmgewebsschädigung gegen die autochthonen Mikroorganismen stattfinden, sondern diese immunologisch toleriert werden, während gleichzeitig die

Erkennung und Abwehr von Pathogenen erfolgt (Brisbin *et al.*, 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung eines funktionstüchtigen GALT beim Huhn durch eine späte Erstfütterung der frisch geschlüpften Küken verzögert wird (Yegani & Korver, 2008).

Der Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die Entwicklung des Immunsystems wird bei der Untersuchung keimfrei aufgezogener Mäuse offenkundig. Diese besitzen nur die angeborene unspezifische und eine rudimentäre, kaum entwickelte spezifische Immunität (Schulze *et al.*, 2008). Werden solche Tiere plötzlich mit einer „normalen“ – d. h. mikrobiell besiedelten – Umwelt konfrontiert zeigen sie eine erhöhte Anfälligkeit gegen Infektionen (Fuller, 1978; Cebra, 1999; Schulze *et al.*, 2008). Andererseits kann durch die Implantation einer niedrig dosierte Mischung mit Bakterien der tierartspezifischen Darmflora, rasch die Entwicklung eines funktionstüchtigen GALTs, welches die Tiere vor einer Infektion mit Umweltkeimen schützt, induziert werden (Shanahan, 2002; O'Hara & Shanahan, 2006; Rhee *et al.*, 2004).

Gramnegative Bakterien haben eine deutlich stärkere immunogene Wirkung als grampositive Mikroorganismen. Dies beruht auf der Immunogenität des Lipopolysaccharidkomplexes (Endotoxin), welcher als Bestandteil der äußeren Zellmembran bei Grampositiven fehlt (Rietschel *et al.*, 1996). Bei diesen Keimen haben wiederum Bestandteile der deutlich dickeren Zellwand, wie Peptidoglycane oder Teichonsäuren, immunogenes Potential (Haller *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2004).

Zwischen der gesunden Darmflora und dem Tier besteht eine intensive Kommunikation, die entscheidend für die Entwicklung und den Erhalt eines voll funktionsfähigen Abwehrsystems ist (Jarchum & Pamer, 2011). Zudem dient eine gewisse Translokationsrate, d. h. eine geringe Übertrittsfrequenz von intestinalen Mikroorganismen ins lymphatische System, als physiologischer Prozess dem Training des darmassoziierten Immunsystems (Schulze *et al.*, 2008). Gleichzeitig tragen die physiologischen intestinalen Mikrobiota zur Integrität des Darmepithels bei und regulieren somit die mikrobielle Translokationsrate, wodurch einer systemischen Infektion mit potentiell pathogenen Vertretern vorgebeugt wird (Savage, 1977; Schulze *et al.*, 2008).

2.2 Nutritive Einflüsse

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3 erwähnt, haben die bei der mikrobiellen Fermentation von Kohlenhydraten entstehenden kurzkettigen Karbonsäuren wie Essig-, Propion-, Butter- und Milchsäure in mehrerlei Hinsicht positiven Einfluss auf den Wirtsorganismus. Über den fermentativen Abbau von Kohlenhydraten, der in erster Linie durch anaerobe Mikroorganismen im Zäkum bewerkstelligt wird, liefern auch nicht hydrolysierbare Oligo- und Polysaccharide dem Wirt Energie (Lan *et al.*, 2005). Für Enterozyten im Dickdarm stellen die kurzkettigen Fettsäuren die wichtigste Energiequelle dar (Nava *et al.*, 2005), zudem stimulieren sie das Wachstum der Epithelzellen (Adil & Magray, 2012); auch Peristaltik, Durchblutung der Darmschleimhaut sowie die Resorption von Wasser und Mineralstoffen/Elektrolyten in den Zäka wird durch diese Verbindungen gefördert (Braun, 2003).

Manche Mitglieder des intestinalen Mikrobioms können bei kohlenhydratreicher Ernährung durch N₂-Fixierung zur Aufrechterhaltung der Stickstoffbilanz ihres Wirtes beitragen (Schulze *et al.*, 2008); dies konnte anhand einer Studie von Parsons *et al.* (1983) auch für Hühner bestätigt werden: hier wiesen konventionell gehaltene Tiere unter faserreicher Fütterung höhere Gehalte an endogenen Aminosäuren auf als keimfreie Hühner, was auf die mikrobielle Synthese dieser Verbindungen schließen lässt.

Im Darm des Huhnes wurden zahlreiche bakterielle Enzyme mit metabolischer Aktivität nachgewiesen. Diese bieten bei der Ernährungsform von Wildtieren vermutlich mehr Vorteile als bei der optimierten Fütterung konventionell gehaltener Broiler (Fuller, 1984). Denn auf diese Weise konkurrieren Mikroorganismen auch mit dem Wirt um Nährstoffe, woraus eine gesteigerte Wachstumsrate bei keimfreien Tieren im Vergleich zu konventionell gehaltenen Hühnern resultiert (Kussaibati *et al.*, 1982). Auch sind bestimmte Intestinalkeime wie manche Clostridien-Spezies in der Lage, Gallensäuren zu dekonjugieren, was wiederum zu schlechterer Futterumsetzung und damit zu einem erhöhten Futteraufwand führt (Smits & Annison, 1996).

Durch die dargestellten Mechanismen kann die Anwesenheit der intestinalen Mikroorganismen die umsetzbare Energie einer bestimmten Diät entweder auf- oder abwerten. Unter konventionellen Haltungsbedingungen kann jedoch davon

ausgegangen werden, dass Hühner mit einer aktiven Mikrobiota einen erhöhten Energiebedarf zur Erhaltung des Grundumsatzes haben (Lan *et al.*, 2005).

2.3 Barrierefunktion/ Competitive Exclusion

Eine wesentliche Funktion der physiologischen intestinalen Mikrobiota ist ihre Barrierefunktion gegenüber der Ansiedlung (potentiell) pathogener Keime im Darm des Wirtsorganismus (Schulze *et al.*, 2008). Durch die verzögerte Besiedlung des Gastrointestinaltraktes bei Küken aus konventioneller Haltung entfällt diese Schutzwirkung in den ersten Lebenstagen der Tiere (Nurmi & Rantala, 1973). Das Phänomen der „Competitive Exclusion“ durch die autochthone Mikrobiota beim frisch geschlüpften Küken wurde erstmals im Jahr 1973 von Nurmi und Rantala beschrieben und wird daher auch nach seinen Entdeckern als „Nurmi-Konzept“ betitelt. Die finnischen Wissenschaftler erkannten, dass Küken kurze Zeit nach dem Schlupf bzw. in den ersten Lebenstagen durch die Applikation von Darminhalt gesunder adulter Tiere vor intestinaler Salmonellenbesiedlung geschützt werden können (Nurmi & Rantala, 1973; Pivnick & Nurmi, 1982). Diese Erkenntnisse sollten später durch zahlreiche Studien weltweit bestätigt und erweitert werden (zusammengefasst in Schneitz, 2005).

Als dieser Lösungsansatz zur Kontrolle von Salmonelleninfektionen in Geflügelbeständen erstmals veröffentlicht wurde, waren fast zwei Jahrzehnte verstrichen, seit 1952 von Milner und Shaffer ein Zusammenhang zwischen dem Alter von Küken einerseits und deren Empfänglichkeit für eine Infektion durch nicht-wirtsadaptierte Salmonellen andererseits hergestellt worden war: Sie machten deutlich, dass die Empfänglichkeit für eine Infektionen durch *Salmonella* Typhimurium nach oraler Aufnahme der Keime mit fortschreitendem Alter der Tiere deutlich abfällt (Milner & Shaffer, 1952). Nachfolgende Studien mit *Salmonella*-Stämmen unterschiedlicher Serovare unterstrichen diese Erkenntnisse und zeigten, dass bei Eintagsküken bereits 100 KbE oral applizierte Erreger ausreichen, um ein Haften der Salmonellen zu erreichen und eine über mehrere Wochen bestehende lokale (intestinale bzw. zäkale) und auch systemische Infektion auszulösen (Methner, 2000; Methner *et al.*, 1997). Ältere Tiere mit etablierter intestinaler Mikrobiota benötigen hingegen eine deutlich höhere Dosis (in Abhängigkeit vom Infektionsstamm mindestens 10^7 KbE/Tier), um eine über

einen längeren Zeitraum bestehende *Salmonella*-Infektion hervorzurufen (Humphrey *et al.*, 1991; Methner, 2000).

Nurmi und Rantala (1973) konnten zeigen, dass sich diese erhöhte Widerstandsfähigkeit mit der Heranbildung einer stabilen autochthonen Darmmikrobiota entwickelt hat. Außerdem gelang ihnen der Nachweis, dass sich die verminderte Empfänglichkeit gesunder, adulter Tier gegenüber *Salmonella*-Serovaren auf hochgradig empfängliche Eintagsküken übertragen lässt: Sie verabreichten eine Aufschwemmung aus Kropf- und Darminhalt gesunder Hühner durch Kropfinstillation an 1-2 Tage alte Küken. 24 Stunden später erfolgte die Konfrontation der Jungtiere mit *Salmonella* Infantis, indem ihnen bis zu 10^6 KbE des Erregers in den Kropf appliziert wurden. Die Empfänglichkeit der Küken für eine Besiedlung des Darmes durch *Salmonella* Infantis verringerte sich dadurch deutlich (Nurmi & Rantala, 1973).

Der bis dahin – und auch heute noch – teilweise unklare antagonistische Wirkmechanismus wurde als Ausschluss pathogener Mikroorganismen durch Konkurrenz beschrieben und an verschiedenen *Salmonella*-Serovaren (Schneitz, 2005), pathogenen *E. coli* (Hakkinen & Schneitz, 1996), *Campylobacter jejuni* (Soerjadi *et al.*, 1982), *Clostridium perfringens* (Craven *et al.*, 1999) und *Yersinia enterocolica* (Soerjadi-Liem *et al.*, 1984) untersucht, wobei sich die Schutzwirkung der autochthonen Darmflora bestätigte. Zudem zeigten die behandelten Tiere eine verbesserte Gewichtsentwicklung, Futterverwertung und niedrigere Verlustraten (Goren *et al.*, 1988).

Rantala legte bereits 1974 nahe, dass die schützende Wirkung applizierter Darmmikrobiota in erster Linie auf der Verabreichung lebender anaerober Bakterien beruht (Rantala, 1974). Dass die Schutzwirkung nur durch vitale Keime hervorgerufen wird, bestätigten Snoeyenbos *et al.* (1978); sie zeigten, dass bakterienfreie Überstände aus Fäkalsuspensionen keine Effekte erzielen. Dabei können Küken auch durch die Verabreichung der Darmmikrobiota bestimmter anderer Vogelarten geschützt werden (Weinack *et al.*, 1982; Impey *et al.*, 1984), die Mikrobiota anderer Tierarten (z. B. von Pferden oder Rindern) entfalten jedoch keine protektive Wirkung (Nurmi & Rantala, 1973).

Als verantwortliche Mechanismen für die hemmende Wirkung der autochthonen Mikrobiota auf die Ansiedlung (potentiell) pathogener Keime werden der

Wettstreit um Nährstoffe, die Bildung hemmender Substanzen (Bakteriozine, dekonjugierte Gallensalze, H_2S), der Einfluss auf die Immunabwehr sowie die Senkung des pH-Werts im Darm durch die von Anaerobiern produzierten flüchtigen Fettsäuren diskutiert (Barnes *et al.*, 1979; Savage, 1977; Schneitz *et al.*, 1998; van der Wielen *et al.*, 2000). Der wahrscheinlich wichtigste Prozess ist jedoch die direkte Konkurrenz um intestinale Bindungsstellen an der Darmschleimhaut bzw. das Blockieren von Bindungsstellen für Salmonellen und andere Pathogene (Lan *et al.*, 2005; Schneitz, 2005). Dafür sprechen auch Studien die zeigen, dass ein Schutz von Küken vor intestinaler Salmonellenbesiedlung bereits wenige (ca. 1-4) Stunden nach Applikation autochthoner Darmmikrobiota an die Tiere erkennbar ist (Soerjadi *et al.*; 1981; Hume *et al.*, 2003).

Kultiviert man unter anaeroben Bedingungen Darminhalt adulter, gesunder Hühner in flüssigen Medien, entfaltet dieser nach Re- Inokulation ins Tier ebenfalls protektive Wirkung; eine deutlich verringerte Effektivität solcher Kulturen tritt ein, wenn bereits vor deren Verabreichung an die Küken ein Kontakt zu Salmonellen bestand (Mead & Barrow, 1990; Methner *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 1998). Somit ist, neben der Sicherstellung hoher Hygienestandards in der Brüterei, auch ein möglichst früher Zeitpunkt zur Verabreichung von Darmflorakulturen anzustreben (Methner, 2000; Schneitz, 2005). Außerdem spielen die Höhe der Infektionsdosis durch das Pathogen (Methner *et al.*, 1997) und die Applikationsform der Kulturen eine bedeutende Rolle (Schneitz, 2005).

Die kombinierte Anwendung von *Salmonella*-Impfstoffen und Darmflorakulturen, welche auch als „Competitive Exclusion“ Kulturen bezeichnet werden, ist grundsätzlich möglich, zudem kann sich dadurch die Schutzwirkung verstärken (Methner *et al.*, 1999). Hingegen führen Antibiotika, Stress und Erkrankungen zu verminderter Effektivität von „Competitive Exclusion“-Kulturen (Schneitz, 2005); nach einer antibiotischen Behandlung kann deren Verabreichung aber die Wiederbesiedlung des Darmes durch die physiologische Mikrobiota unterstützen und die Tiere so vor einer Reinfektion schützen (Methner, 2000).

Anaerobe Kulturen aus dem Zäkuminhalt von gesunden, salmonellenfreien adulten Tieren zeigten die beste Wirksamkeit gegen eine Infektion durch pathogene Keime (Methner, 2000). Darmflora-Präparate mit nicht vollständig definierter bakterieller Zusammensetzung können jedoch weder als Impfstoff noch als Medizinalprodukt oder Futtermittelzusatzstoff klassifiziert werden und

sind – auch aufgrund des potentiellen Risikos der Übertragung von geflügel- und/oder humanpathogenen Erregern – in Deutschland nicht zugelassen (Methner, 2000; Hafez, 2012). Die Schwierigkeiten bei der Entwicklung effektiver Präparate definierter Zusammensetzung liegen im unzureichenden Wissen über die tatsächlich schützenden Spezies der intestinalen Mikrobiota und über die zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen ihrer protektiven Wirkung (Methner, 2000). Zudem sind ca. 80 % der intestinalen Bakterien mit klassischen kulturellen Methoden nicht anzüchtbar, insbesondere obligat anaerobe Mikroorganismen sind oft sehr schwer zu kultivieren (Gong *et al.*, 2002; Hume *et al.*, 2003).

3 Auswirkungen von Antibiotika auf die intestinalen Mikrobiota

Durch den gezielten Einsatz von antibiotischen Substanzen sollen Infektionserreger entfernt und mikrobiell verursachte Störungen im Zielorgan beseitigt werden. Doch auch Mitglieder des physiologischen intestinalen Mikrobioms werden beim Antibiotikaeinsatz eliminiert, wodurch sich Keimgruppenverhältnisse verschieben und Störungen im Gastrointestinaltrakt hervorgerufen werden können (Sjolund *et al.*, 2003; Yim *et al.*, 2006).

Auch die Einflüsse der physiologischen intestinalen Mikrobiota auf den Wirtsorganismus werden dadurch reduziert; so zeigen z. B. Mäuse nach erfolgter Antibiotika Behandlung eine herabgesetzte Barrierefunktion ihrer autochthonen Darmmikrobiota mit der Folge einer erhöhten Empfänglichkeit für intestinale Salmonellen-Besiedlungen (Miller *et al.*, 1957; Buffie & Pamer, 2013). Dabei hängt das Ausmaß der antibiotikainduzierten Veränderungen im intestinalen Mikrobiom von der Art des eingesetzten Antibiotikums ab; beispielsweise können Fluorquinolone, Clindamycin und Ampicillin starke Veränderungen im Spektrum der Darmkeime hervorrufen, wobei auch die intravenöse Applikation gallengängiger Substanzen zu hohen Anreicherungen im Darm führt (Schulze *et al.*, 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich das intestinale Mikrobiom nach dem Absetzen bestimmter Antibiotikatherapien nur oberflächlich, d. h. auf Gattungs- und Speziesebene normalisiert, während es zu langfristigen Veränderungen auf Stammesebene kommt (Jernberg *et al.*, 2007, Jernberg *et al.*, 2010; Jakobsson *et al.*, 2010).

Durch die Anwendung antimikrobieller Substanzen wird zudem resistenten Keimen ein Selektionsvorteil geboten, sodass nach einer Antibiotikaaanwendung vermehrt Resistenzgene im Darm nachweisbar sind (Alexander *et al.*, 2011; Modi *et al.*, 2014); diese Veränderungen der intestinalen Mikrobiota können ebenfalls noch Jahre nach erfolgter Antibiotikagabe persistieren (Jernberg *et al.*, 2007, Jernberg *et al.*, 2010; Jakobsson *et al.*, 2010). Die Verabreichung subtherapeutischer Antibiotikadosen – wie sie z. B. im Rahmen des Einsatzes leistungsfördernder Substanzen in der Nutztieraufzucht bis zu deren Verbot ab dem 01. Januar 2006 auch in der EU jahrzehntelang praktiziert wurde – oder eine unkorrekte Verabreichungsdauer begünstigen den Anstieg der Konzentration resistenter Keime im Darm; darüber hinaus ist bekannt, dass über die sogenannte „Kreuzselektion“ auch solche Resistenzen zunehmen können, die sich gegen andere Wirkstoffe als den eingesetzten richten (Darai & Sonntag, 2009; Looft *et al.*, 2012).

Grundsätzlich kann zwischen der intrinsischen – d. h. der natürlichen Resistenz, die allen Bakterien einer bestimmten Art eigen ist – und der erworbenen Resistenz unterschieden werden (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Letztere kann zum einen durch Mutationen chromosomaler Gene entstehen oder aus einem anderen Organismus neu erworben werden, wobei hohe Populationsdichten, wie sie auch im Darm anzutreffen sind, die Übertragung von Resistenzgenen begünstigen (Feuerpfeil *et al.*, 1999; Hartmann, 2005). Bakterielle Resistenzen können wiederum vertikal (bei der Teilung auf die Tochterzellen) oder horizontal weitergegeben werden. Beim horizontalen Gentransfer wird genetisches Material auf unterschiedlichen Wegen von einem Bakterium auf einen anderen Keim derselben oder auch einer anderen Art übertragen (Hartmann, 2005). Diese Weitergabe kann z. B. durch Konjugation erfolgen, d. h. mobilisierbare genetische Strukturen werden direkt von einem Spender (Donor) auf den Empfänger übertragen. Die hauptsächlichen genetischen Strukturen für den Transfer von Resistenzgenen sind mobile genetische Elemente wie Plasmide, Transposons oder Genkassetten (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Auch Bakteriophagen können die Übertragung von Resistenzgenen zwischen Bakterien vermitteln (Transduktion); beim Prozess der Transformation nehmen kompetente Keime freie DNA aus der Umwelt auf (Hartmann, 2005). So erlangen Bakterien die Fähigkeit, durch Veränderung der Permeabilität ihrer Zellwand, Ausschleusen des

Antibiotikums aus der Zelle, Veränderungen im Target-Protein oder durch enzymatische Inaktivierung von Verbindungen, der Wirkung antibiotischer Stoffe zu entgehen (Allen *et al.*, 2010).

Auf diesem Weg kann das intestinale Mikrobiom in Folge der Behandlung mit antimikrobiellen Wirkstoffen zu einem Reservoir an resistenten Keimen werden (Modi *et al.*, 2014); im Hühnerdarm können diese Mikroorganismen wiederum Resistenzgene auf Keime mit zoonotischem Potential, wie z. B. *Campylobacter* spp. übertragen, die dadurch zu einer besonderen Gefahr für den Menschen werden (Aarestrup & Wegener, 1999). Auch bei *Salmonella* spp.-Isolaten aus Geflügelmastbeständen und Geflügelfleisch werden teilweise erhebliche Resistenzen nachgewiesen, unter anderem gegen sogenannte „Reserveantibiotika“ wie Fluorquinolone oder Cephalosporine, welche nur nach strenger Indikationsstellung in der Tierhaltung eingesetzt werden sollten, um ihre Verfügbarkeit für Patienten mit lebensbedrohlichen Infektionen zu erhalten (Zhao *et al.*, 2008; BTK, 2010).

Bakterien sind außerdem in der Lage, Resistenzgene zu akkumulieren und so Multiresistenzen auszubilden (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Solche multiresistenten Keime können regelmäßig sowohl in Masthähnchenbetrieben als auch in Hühnerfleisch nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2008; Dullweber, 2010; Schwaiger *et al.*, 2012; Laube *et al.*, 2013; Brandt, 2010).

Gleichzeitig sind antibiotikaresistente Infektionserreger zu einer globalen Bedrohung geworden (WHO, 2014). So führt der ansteigende Prozentsatz an Resistenzen bei (potentiell) pathogenen Keimen insbesondere bei immunsupprimierten Menschen zu lebensbedrohlichen Infektionen mit geringen therapeutischen Optionen (Tomasz, 1994). Dem Eintrag von resistenten Mikroorganismen aus der Tierhaltung nach beruflicher Exposition oder über die Lebensmittelkette wird hohe Bedeutung beigemessen (Lahuerta *et al.*, 2011). Zudem werden viele antibiotische Substanzen nahezu unverändert vom Tier ausgeschieden und gelangen nun z. B. in Form von Gülle in die Umwelt und in das Grundwasser (Feuerpfeil *et al.*, 1999; Sarmah *et al.*, 2006). Auch sind Antibiotika, wie z. B. Enrofloxacin während einer Behandlung von Hühnern unter therapeutischer Dosierung (10 mg/kg KG über 5 Tage) in Sedimentationsstäuben und Bioaerosolen detektierbar, sodass wirtschaftlich genutzte Tiere, die in einem geschlossenen System gehalten werden, diese Substanzen in subinhibitorischen

Konzentrationen wieder aufnehmen, wodurch ebenfalls resistente Keime selektiert werden können (Scherz, 2013).

Die Verwendung von antibiotischen Leistungsförderern als Futtermittelzusatz ist seit dem 1. Januar 2006 in der EU verboten; Futtermittelzusatzstoffe mit pharmakologischer Wirkung dürfen in Geflügelbeständen daher nur noch in Form der zugelassenen Kokzidiostatika angewendet werden (VO EG 1831/2003), diese besitzen jedoch teilweise auch eine antibakterielle Wirkung (Richter *et al.*, 2009). Nach den „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“ ist die prophylaktische Anwendung von Antibiotika nur in besonders begründeten Ausnahmefällen vertretbar (BTK, 2010). Der metaphylaktische Einsatz von Medikamenten in der Geflügelhaltung ist hingegen meist unumgänglich, da sich die Trennung von kranken und in der Inkubationsphase befindlichen Tieren praktisch nicht bewerkstelligen lässt (Richter *et al.*, 2009). Da die gesundheitlichen Probleme beim Geflügel in der Regel multifaktorielle Ursachen haben und die klinischen Symptome bzw. die pathologisch-anatomischen Veränderungen häufig nicht auf die Ätiologie schließen lassen, sind labordiagnostische Untersuchungen zwingend erforderlich (Hafez, 2003; Richter *et al.*, 2009). Anzustreben ist eine weitere Optimierung des Arzneimitteleinsatzes z. B. durch genetische Selektion der Tiere in Richtung erhöhter Resistenz gegenüber bestimmten Erkrankungen, den sachgemäßer Einsatz von und Umgang mit Arzneimitteln durch den behandelnden Tierarzt und den Tierhalter, Resistenzmonitoring und die Weiterentwicklung prophylaktischer Maßnahmen (Richter, 2009). Außerdem wird der Einhaltung des Hygienemanagements (insbesondere im Brüteriebetrieb) erhebliche Bedeutung beigemessen (Hausleitner, 2011). Ein signifikanter Abfall der Leistungsparameter ist durch eine Reduktion des Antibiotikaeinsatzes im Hähnchenmastbetrieb entgegen anderslautender Befürchtungen nach Meinung von Bachmeier (2012) nicht zu erwarten.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Materialien zur Probengewinnung

Baktolin Waschlotion	Bode, 972529
Ethanol	Roth, 9065.5
Flüssiger Stickstoff	
Hautdesinfektion Pumpspray	Heiland, 390-455
Ligaturfaden	B.Braun
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, 52001M
Petrischalen	Sarstedt, 821473
Petrischalen	Sarstedt, 821473
Polypropylenröhrchen	Greiner Bio ONE
15 ml	188271
50 ml	227261
Skalpell	Aesculap
Skalpellhalter, Pinzetten, Scheren	
Standard I Nährbouillon	Merck, 1.07882
Wattetupfer mit Nährmedium	Becton Dickinson

1.2 Materialien für die mikrobiologisch-kulturellen Untersuchungen

1.2.1 Geräte

Analysenwaagen	Sartorius, Research und LC 4200
Brutschrank	Memmert, U40 und 500
Bunsenbrenner	Usbeck, 1040/1 Nr. 92.03c451
CO ₂ -Brutschrank	Thermo, 351
ELISA-Plate-Reader	Dynex, MRX Revelation
Gefrierschrank -70 °C	Heraus, Hera freeze
Gefriertruhe -20 °C	Bosch, automatic

Horizontalschüttler	Heidolph Titramax, 1000
Koloniezählgerät	Schütt Labortechnik, 30808002
Kühlschrank	Privileg, Öko Energiesparer
Laborschüttler	IKA-Labortechnik, KS 250
Lichtmikroskop	Leitz Typ, 307-127.001
MALDI-TOF-Massenspektrometer	Bruker Microflex™ LT, 233935.00014
Micronaut Sprint	Merlin Diagnostic, ST-6-001-001
pH-Meter	WTW, pH 330
Sterilbank	Antair BSK (Typ BSK/6)
UV-Vis Spektralphotometer	Shimadzu, UV-1202
Zentrifuge	Hermle Z 383

1.2.2 Gebrauchsmaterialien

Anaerobiertöpfe	Merck, 107040; BD GasPak™, 60672
Anaeroclip	Merck, 1.14226
Aufbewahrungsboxen	VWR, 479-0310
Einsätze für Cryoboxen	VWR, 479-0364
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Marienfeld
Glaskolben	
Glasspatel	Brennstein Laborbedarf
McFarland Standard	bioMérieux, SA 818531501
Mehrkanal-Pipette	Transferpipette® S-8 30 – 300 µl
MSP 96 Target ground steel	Bruker, 224990
Pipetten	Eppendorf Research
0,5-10µl	VWR, 613-3583
10-100 µl	VWR, 613-3585
100-1000 µl	VWR, 613-3587
Pipettus accu-jet®	Brand, 26300
Reagenzgläser, steril	Schott Duran, 212-1116

Reagenzglashalter VWR, 212-6122

Sterile Glaspipetten

1.2.3 Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Mikrotiterplatten Greiner Bio One, 2014-3

Abdeckfolie Merlin

Anaerocult A Merck, 1.16819.0001

Anaerocult IS Merck, 1.13829.0001

Baktolin Waschlotion Bode, 974122

Cryoröhrchen Brand, 4791203

Einmalösen VWR, 631-2211

Einmalspritzen (20 ml) Terumo, SS+T20ES1

Homogenisierbeutel Whirlpack[®], Art. E 255.1

Korkbohrer (Ø 5mm) VWR, 217-9690

Minisart-Membranfilter (0,2 µm) Sartorius, 514-7011

Nitrilhandschuhe Kimberly-Clark, 52001M

Objektträger mit Mattrand Henry Schein, 9002573

Petrischalen Sarstedt, 821473

Pipettenspitzen für Mikronaut Sprint Merlin, ST3-001-500

Pipettenspitzen mit Filter 10 µl Sarstedt, 70.762.411

Pipettenspitzen Sarstedt

100 µl 70.760

1000 µl 70.762

Polypropylenröhrchen Greiner Bio One

15 ml 188271

50 ml 227261

Reaktionsgefäße Sarstedt

1,5 ml 72.706.400

2 ml 72.695.400

Resistenztest-Panels Merlin

GN/GP	ES-LGL-GNP
GN	ES-LGL-GN
Enterokokken	ES-LGL-EK
Skalpellklingen	Aesculap
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Wattestäbchen, steril	VWR, 1158270
Zahnstocher	DM
Zellkulturflaschen	Greiner Bio One, 660160

1.2.4 Feste Nährmedien

Blutagar

Blutagar-Basis Nr. 2	60 g	Oxoid, CM271
defibriniertes Schafblut	100 ml	Fiebig, 1000100
dest. H ₂ O	1 ½ l	

CATC-Agar

CATC-Agar	54,5 g	Sifin, TN 1273
Tween 80	1 ml	Roth, 9139.1
dest. H ₂ O	1 l	

Fluorocult ECD-Agar

Fluorocult ECD-Agar	53,1 g	Merck, 1.04038
dest. H ₂ O	1 l	

Gassner-Agar

Gassner-Agar	77 g	Merck, 1.01282
dest. H ₂ O	1 l	

LAMVAB-Agar

Lösung A:

MRS-Broth	104,4 g	Merck, 1.10661
Cystein-HCl-Lösung	1 ml	Merck, 2839
Bromcresol-Grün-Lösung	1 ml	Applichem, A 1051

dest. H ₂ O	1 l	
------------------------	-----	--

Lösung B:

MRS-Agar	40 g	Oxoid, CM361
Agar-Agar	10 g	Oxoid, L11
dest. H ₂ O	1 l	

Lösung C:

Vancomycinhydrochlorid 20 ml		Sigma, V0045000
------------------------------	--	-----------------

MRS-Agar

MRS-Agar	62 g	Oxoid, CM361
Agar-Agar	4 g	Oxoid, L11
dest. H ₂ O	1 l	

Normalagar

Blutagar-Basis Nr. 2	60 g	Oxoid, CM271
dest. H ₂ O	1 1/2 l	

Schaedler-Agar

Schaedler-Agar	41,9 g	BD, 212189
defibriniertes Schafblut	50 ml	Fiebig, 1000100
1 %ige Vitamin K ₁ -Lsg.	1 ml	Merck, 5.01890
dest. H ₂ O	1 l	

1.2.5 Flüssige Nährmedien**LB-Medium**

LB-Medium	20 g	Roth, X964.1
dest. H ₂ O	1 l	

Müller-Hinton-II-Bouillon (kationenadjustiert)

Müller-Hinton-II-Bouillon	22 g	BD, 212322
dest. H ₂ O	1 l	

MRS zur Kryokonservierung

MRS-Broth	26 g	Merck, 1.10661
Glycerol (20 %)	100 g	Applichem, A 3552
dest. H ₂ O	500 ml	

Nutrient Broth zur Kryokonservierung

Nutrient Broth No. 2	12,5 g	Oxoid, CM67
Glycerol (15 %)	75 g	Applichem, A 3552
bidest. H ₂ O	500 ml	

Phenolrotbouillon

Phenolrotbasis	7,5 g	Merck, 1.10987
dest. H ₂ O	450 ml	

Zusätze für 10 %ige Zuckerlösung:

Xylose (D (+)- Xylose)	5 g	Merck, 1.08689
Arabinose (L (+)-Arabinose)	5 g	Merck, 1.01492
Manitol (D (-)-Manitol)	5 g	Merck, 1.05982
Natriumpyruvat (Na-Pyruvate)	5 g	Fluka, 15990
+ jeweils bidest. H ₂ O	50 ml	

1.2.6 LösungenNaCl-Lösung, gepuffert

NaCl	7,65 g	Merck, 1.06400
Na ₂ HPO ₄	0,724 g	Merck, 1.06586
KH ₂ PO ₄	0,21g	Merck, 1.04873
dest. H ₂ O	1 l	

NaCl-Lösung, 0,9 %

NaCl	9 g	Merck, 1.06400
dest. H ₂ O	1 l	

PBS-Lösung

PBS-Puffer	9,55 g	Applichem, A 0964,9050
dest. H ₂ O	1 l	

STV (Saline-Trypsin-Versen)

Saline	100 ml	
NaCl	80 g	Merck, 1.06400
Glukose	10 g	Sigma, G0350500
KCl	2 g	Merck, 1.04936
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	11,5 g	Merck, 1.06586
KH ₂ PO ₄	2 g	Merck, 1.04873
Phenolrot (0,1 %)	100 ml	Merck, 1.07241
dest. H ₂ O	900 ml	
Trypsin (1,25 %)	50 ml	PAA, L11-001
Versen (1 %)	25 ml	Sigma, E-6511
dest. H ₂ O	825 ml	

Trypanblau-Lösung

Trypanblau (0,5 %)	1 ml	Biochrom, L6323
PBS-Dulbecco	8,9 ml	Biochrom, L182-5005

Zimtsäurematrix

Zimtsäure	14 mg	Aldrich, 476870
Acetonitril	500 µl	Fluka, 34967
Trifluoressigsäure	25 µl	Fluka, 74564
dest. H ₂ O	475 µl	

1.2.7 ReagenzienGramfärbung

Aceton	Applichem, 11-36-66-67
Immersionsöl	Merck, 1.15577
Karbolfuchsinlösung	Merck, 9215

Kristallviolett-Lösung	Merck, 1.09218
Lugol'sche Lösung	
Jod doppelt sublimiert	Merck, 4761
Kaliumiodid neutral	Merck, 5043
Haemophilus-Supplement	Oxoid SR 0158

MTT-Test

Dimethylsulfoxid DMSO	Merck, 1.02952
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, S0115
Gliotoxin	Sigma, G9893
L-Glutamin	PAA, M11-004
MTT	Sigma, M2128
Penicillin/Streptomycin	PAA, P11-010
RPMI 1640	Sigma, R8758

1.2.8 Weitere Chemikalien und Zusätze

Bacterial test standard	Bruker, 255343
Ethanol	Roth, 9065.5
Glycerol	Applichem, A 3552
Kovacs Indol-Reagenz	Merck, 1.09293
Natronlauge (NaOH)	Sigma, S5881
Oxidase-Reagenz	Sigma, T3134
Salzsäure (HCl)	Merck, 1.09057
Streptomycinsulfat	Sigma, S6501
Teracyclin Hydrochloride	VWR, 97061-638
Tween 80	Roth, 9139.1
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, 8070.2

1.2.9 Software

ELISA-Plate-Reader Software	Dynex Revelation Software, Version 4.22
-----------------------------	--

Excel 2010	Microsoft
MALDI Biotyper Software	Bruker
SigmaPlot 12.0	Sigma

1.2.10 Zellkultur

Verozellen

(Nierenzellen Grüner Meerkatzen) DSMZ, ACC 33

1.2.11 Referenzstämme

<i>Bacillus subtilis</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. 84
<i>E. coli</i>	DSM 1103
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477
<i>Clostridium perfringens</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. 12
<i>E. coli</i> O:101 K:99	Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. 33
<i>Salmonella</i> Typhimurium	DSM 554
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	DSM 22
<i>Enterococcus mundtii</i>	DSM 4838
<i>Salmonella</i> sp.	Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. II-A3-S-05a
<i>E. coli</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. I-K-2-Eco1

1.3 Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen

1.3.1 Geräte

Brutschrank	Memmert U40
Elektrophoresekammer Agarosegele	Peqlab, 40-1214
Elektrophoresekammer Polyacrylamidgele	Peqlab, 45-2020-i
Flockeis Automat	Scotsman, AF80

Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Homogenisator	Qiagen, Tissue Lyzer II, 85300
Horizontal Schüttler	New Brunswick Scientific Co., G10, Gyrotory Shaker
Kälte-Umwälzthermostat	Witge Labortechnik, Wise Circu
Kälte-Umwälzthermostat	Witeg Labortechnik, Wise Circu
Kühlschrank	Privileg
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001K
Mikrowelle	Alaska
Mikrozentrifuge	Eppendorf, Minispin
Scanner	Agfa Arcus, 1200
Spannungsgerät für Gele	Peqlab, EV 243
Spektrophotometer	Peqlab, NanoDrop® ND-1000
Thermocycler T3000	Biometra 050-724
Thermomixer	Eppendorf Comfort 535502652
Tischzentrifuge	Hettich, Mikro 200
UV-Geldokumentation	Intas UV-Systeme
Vortex Adapter	MoBio, 13000-V1-15
Vortexer	Vortex Genie2 Scientific Industries, G-560E
Waage	Ohaus, PRO SPU402
Zentrifuge	Heraus Biofuge 28RS, 1800 94

1.3.2 Gebrauchsmaterialien

Elektrophoresekammer für Agarosegele	Peqlab, 40-1214
Elektrophoresekammer für	
Polyacrylamidgele	Peqlab, 45-2020-i
Färbewannen	Heilland, 420-575
Finnpipette (1-5 ml)	VWR, 613-2520
Laborflaschen mit DIN-Gewinde	Duran, 21801145

Pipetten	Eppendorf Research
0,5-10µl	VWR, 613-3583
10-100 µl	VWR, 613-3585
100-1000 µl	VWR, 613-3587
Reagenzgefäße	Duran, 261303
Wellkamm für Agarosegele	Peqlab, 40-1214-12D
Wellkamm für Polyacrylamid-Gele	eigene Schablone aus PTEE-Folie (0,4 mm)
Wonder wedge separation tool	Novodirect, SE1514

1.3.3 Verbrauchsmaterialien

Alufolie	Real
Einmalösen	VWR, 631-2211
Einmalspritzen (20ml)	VWR, 6120118
Frischhalte Folie	Real
Glasplatte ausgeschnitten, 20x20 cm	Peqlab, 45-2020-20R
Glasplatten, 20x20 cm	Glaserei Freising
Glass beads, 212-300 µm	Sigma, G9143-500G
Nitrilhandschuhe	Genaxxon, M6140.100M
Petrischalen	Sarstedt, 821473
Pipettenspitzen (1-5 ml)	VWR, 612-1484
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt
1 ml, steril	701.115.410
100 µl, steril	70.760.412
10 µl, steril	70.762.411
Polypropylenröhrchen	Greiner Bio ONE
15 ml	188271
50 ml	227261
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 8er Kette	Sarstedt, 72.991.002

Reaktionsgefäße	Sarstedt
0,5ml	72.735.002
1,5 ml	72.706.400
2 ml	72.695.400
Skalpellklingen	Aesculap
Spritzenvorsatzfilter steril	ZEFA, Z.3210745

1.3.4 Chemikalien und Enzyme

100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, N3231L
Agarose	Genaxxon, M3044.0500
AgNO ₃ 0,5g	Sigma, S7276
Ammoniumacetat 0,5 M	Sigma, A1542
APS	ICN Biomedicals, 7727-540
Borsäure	Applichem, A3581.1000
Bromphenolblau, 4 % 0,25 ml	Merck, 1.08122.0025
CTAB 3,6446 g	Applichem, A6284.0100
dNTP-Mix	Qiagen, 201901
EDTA 1 mM	Merck, 1.08454.0250
Essigsäure	VWR, 1.00063.2511
Ethanol	VWR, 1.00983.2511
Ethidiumbromid	Sigma, E-8751
Ficoll 400 2,5g	Merck, 341691-250GM
Formaldehyd	Sigma, F8775
Formaldehydlösung, 37 % 1,2 ml	Sigma, F8775
Glycogen	Invitrogen, 10814-010
HCl (pH 8)	Merck, 1.00319.1000
HotStar Taq DNA Polymerase 5 U/μl	Qiagen, 203203
Isopropanol	VWR, 1.09634.2511
Lamda-Exonuclease	New England Biolabs, MO262S
Lysozym	Sigma, L6879

Magnesiumacetat 10 mM	Sigma, M5661
MDE-Gellösung	Lonza, 50620
Na ₂ CO ₃ 33,75g	Sigma, S7795
Na ₂ -EDTA 0,5 ml	Merck, 1.08454.0250
Na ₂ EDTA 1 mM	Merck, 1.08454.0250
NaCl	Merck, 1.06400.1000
NaOH 0,04g	Merck, 1.06498.1000
Natriumthiosulfat, 0,2 % 600 µl	Sigma, F7026
Nuclease-freies Wasser	Promega, P1193
PCR-Puffer, 10x	Qiagen, 1005479
Proteinase K	Macherey-Nagel, 740506
Repel Silane	Applichem, A0818
SDS 0,1 %	Sigma, L-4390-25G
TEMED	Applichem, A1148.0100
Tris-Base	Merck, 1.08382.2500
Xylene Cyanol 0,25g	Sigma, X4126

1.3.5 Medien und Lösungen

1x TE-Puffer

Tris	1,21 g	Merck, 1.08382.2500
EDTA	0,37 g	Merck, 1.08454.0250
HCl (pH 8)		Merck, 1.00319.1000
bidest. H ₂ O	1 l	

10x TBE

Tris	108 g	Merck, 1.08382.2500
Borsäure	55 g	Applichem, A3581.1000
EDTA (pH 8,0) [0,5 M]	40 ml	Merck, 1.08454.0250
bidest. H ₂ O	1 l	

Bind Silane Lösung

Ethanol	10 ml	Merck, 100983
Essigsäure	100 µl	Merck, 100063
Bind Silane	100 µl	Applichem, A3797

“Crush and Soak”-Puffer

Ammoniumacetat	0,5 M	Sigma, A1542
Magnesiumacetat	10 mM	Sigma, M5661
Na ₂ EDTA	1 mM	Merck, 1.08454.0250
SDS 0,1 %		Sigma, L-4390-25G

CTAB 0,2 M – NaCl 0,5 M

CTAB	3,6446 g	Applichem, A6284.0100
NaCl	1,461 g	Merck, 1.06400.1000
bidest. H ₂ O	50 ml	

Entwicklerlösung

Na ₂ CO ₃	33,75 g	Sigma, S7795
Formaldehydlösung, 37 %	1,2 ml	Sigma, F8775
Natriumthiosulfat, 0,2 %	600 µl	Sigma, F7026
bidest. H ₂ O	600 ml	

Färbelösung

AgNO ₃	0,5 g	Sigma, S7276
Formaldehydlösung, 37 %	750 µl	Sigma, F8775
bidest. H ₂ O	500 ml	

Ladepuffer für Agarosegele

Ficoll 400	2,5 g	Merck, 341691-250GM
Na ₂ -EDTA	0,5 ml	Merck, 1.08454.0250
Bromphenolblau, 4 %	0,25 ml	Merck, 1.08122.0025
bidest. H ₂ O	10 ml	

Ladepuffer für SSCP-Gele

NaOH	0,04 g	Merck, 1.06498.1000
Xylene Cyanol	0,25 g	Sigma, X4126
Bromphenolblau	0,25 g	Merck, 1.08122.0025
Formamid	95 ml	Merck, 344206-1L
bidest. H ₂ O	5 ml	

SSCP-Polyacrylamidgellösung (MDE Konzentration 31, 20 %)

10x TBE	2,5 ml	
2 x MDE	7,8 ml	Lonza, 50620
TEMED	24 µl	Applichem, A1148.0100
APS, 40 %	60 µl	ICN Biomedicals, 7727-540
bidest. H ₂ O	14,7 ml	

1.3.6 Kits zur DNA-Extraktion und Aufreinigung

“DNeasy Blood & Tissue Kit”	Qiagen, 69504
GenElute PCR Clean Up Kit	Sigma-Aldrich NA 1020-1KT
„PowerSoil Kit“	MoBio Laboratories Inc., 12888-100

1.3.7 PrimerCom-PCR

Com 1:

CAGCAGCCGCGGTAATAC Metabion

Com 2-Ph:

CCGTCAATTCCTTTGAGTTT Metabion

RAPD-PCR

D8635:

GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC Metabion

1.3.8 Referenzstämme

<i>Corynebacterium mycetoides</i>	DSM 20148
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477

<i>Enterococcus mundtii</i>	DSM 4838
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103
<i>Helcococcus ovis</i>	DSM 21504
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene, Nr. 147
<i>Mycoplasma bovis</i>	DSM 22781
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 2569
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM 2134

1.3.9 Software

Excel 2010	Microsoft
Geldokumentationssoftware	Intas GDS Version 3.01
Software GelCompar [®] II	Applied Maths

2 Methoden

2.1 Überblick über den Untersuchungsgang

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier Tiergruppen beprobt, um zunächst die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Hühnern aus unterschiedlichen Haltungsformen mit Hilfe klassischer und molekularer bakteriologischer Methoden nachzuvollziehen und Unterschiede in der Zusammensetzung ihres Darm-Mikrobioms zu analysieren. Anhand dabei gewonnener Erkenntnisse wurden im Anschluss potentiell protektive Vertreter der physiologischen Mikrobiota isoliert und im Hinblick auf ihre Eignung als potentielle Inokulumstämme im Sinne einer „competitive exclusion“ weiter charakterisiert.

Einen Überblick über den Versuchsaufbau bietet Abbildung 1.

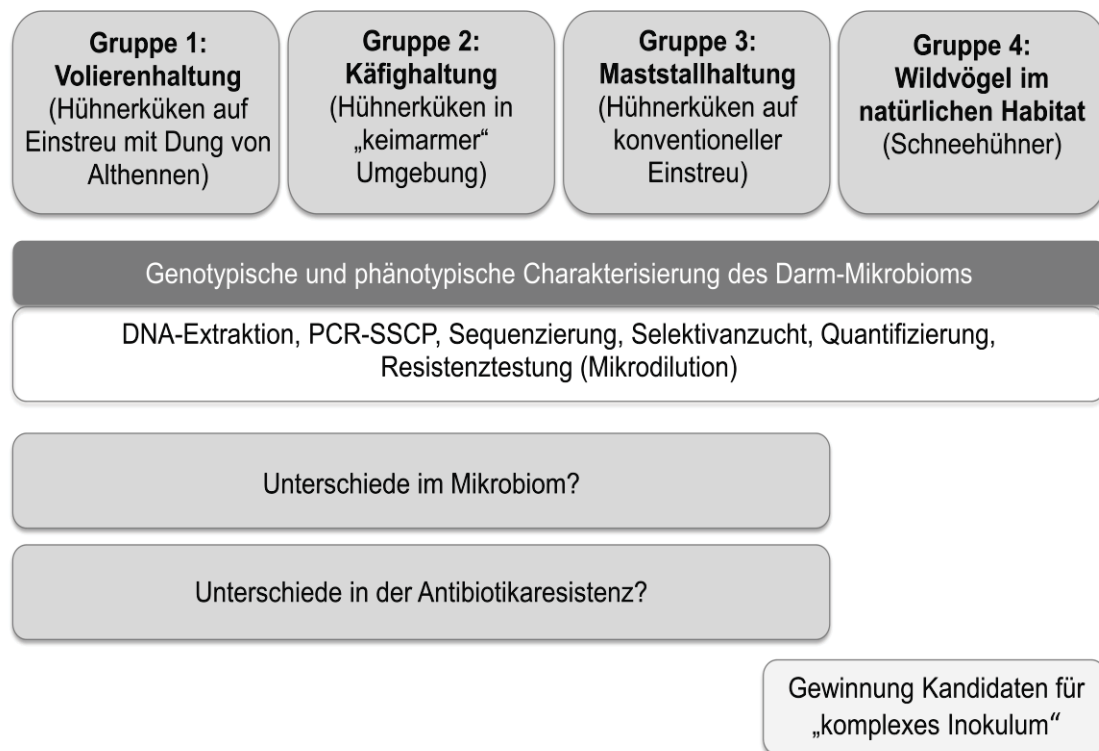


Abbildung 1: Überblick über den Versuchsaufbau

2.1.1 Gruppen 1-3: Küken aus Volieren-, Käfig-, und Maststallhaltung

Bei Küken der dargestellten Gruppen 1-3 wurde die Entwicklung ihres intestinalen Mikrobioms in Zäkuminhalt sowie in der zäkalen Mukosa anhand klassischer und molekularer bakteriologischer Methoden untersucht. Abbildung 2 skizziert die dabei angewandte Vorgehensweise.

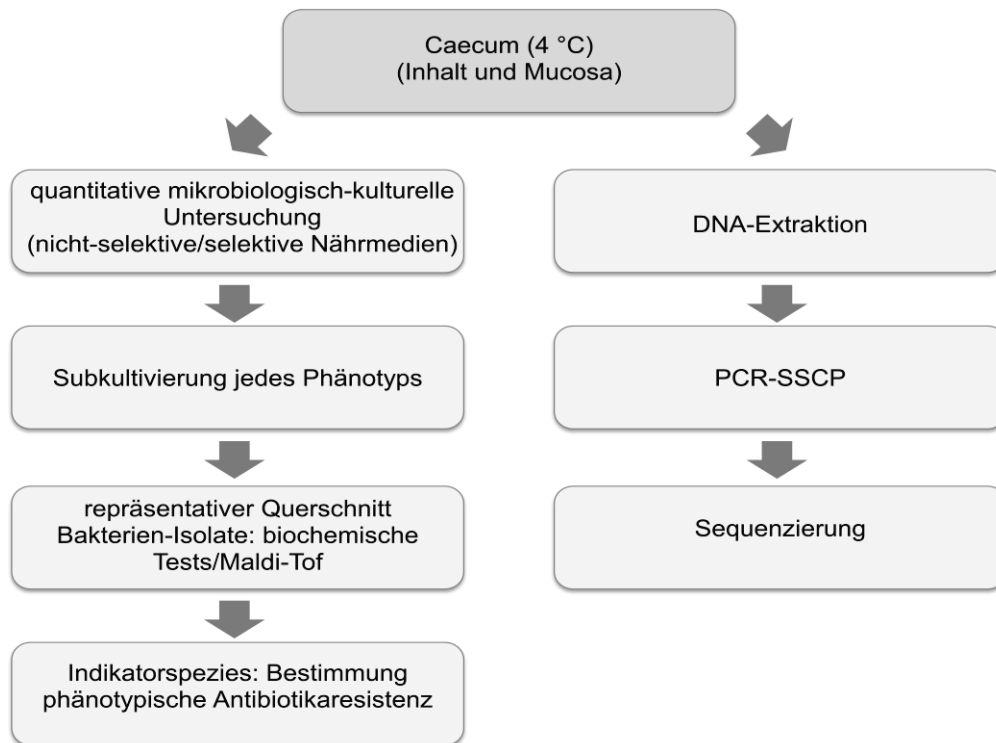


Abbildung 2: Überblick über den Untersuchungsgang zur Entwicklung des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Volierenhaltung, Käfighaltung und Maststallhaltung

Bei den 87 beprobten Tieren aus Volierenhaltung, Käfighaltung und Maststallhaltung handelte es sich um weibliche und männliche Hühner der Linie Ross aus der Brüterei Süd, Regenstein, die keinen Kontakt zum Muttertier hatten. Ab dem Zeitpunkt des Schlupfes waren die Küken unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt.

Gruppe 1: Volierenhaltung

Diese Tiergruppe schlüpfte aus Eiern, welche zuvor weder gewaschen noch desinfiziert worden waren. Außerdem hatten diese Hühner während ihrer ersten Lebenswoche über die Einstreu ständigen Kontakt zu Althennenkot.

Gruppe 2: Käfighaltung

Jungtiere dieser Untersuchungsgruppe schlüpften aus unbehandelten Bruteiern (vgl. Gruppe 1) und wurden unmittelbar nach dem Schlupf in desinfizierten Käfigen ohne Einstreu aufgestellt.

Gruppe 3: Maststallhaltung

Diese Küken schlüpften unter den Hygienemaßnahmen der kommerziellen Geflügelhaltung im Brüteriebetrieb und wurden anschließend im konventionellen Maststall aufgezogen.

2.1.2 Gruppe 4: Wildvögel im natürlichen Habitat

In einem weiteren Versuch wurden Kloakentupferproben von finnischen Schneehühnern (*Lagopus*, n = 20) mit Hilfe sowohl kultureller als auch molekularbiologischer Methoden analysiert. Anhand dieser Proben sollte einerseits Aufschluss über die physiologische Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms von Hühnern aus natürlichem Habitat gewonnen werden, zum anderen stellten die Wildvogelproben eine mögliche Quelle zur Gewinnung antibiotikasensibler potentieller Inokulumstämme dar. Basierend auf den Ergebnissen zur Untersuchung des intestinalen Mikrobioms der vier beprobten Tiergruppen wurden daher ausgewählte Isolate aus Kloakentupferproben vom Wildhuhn im Hinblick auf ihre Eignung als Inokulumstämme weiter charakterisiert. Das Vorgehen hierbei wird in Abbildung 3 dargestellt.

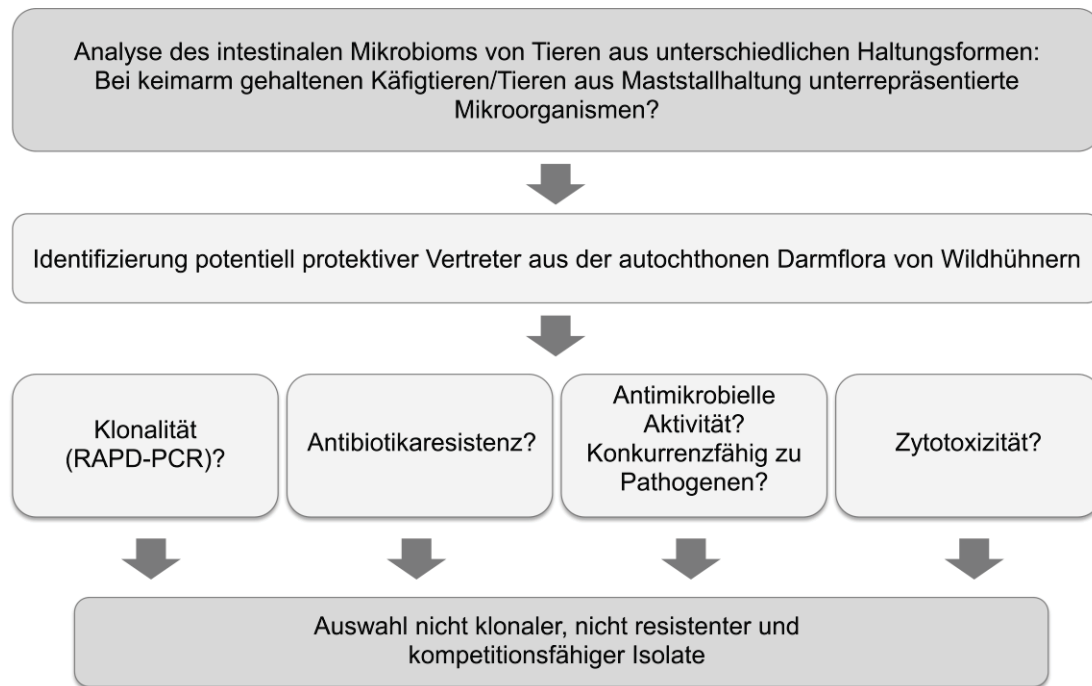


Abbildung 3: Vorgehen zur Auswahl potentieller Inokulumstämme

2.2 Versuchsansatz

2.2.1 Gruppe 1 und 2: Tiere aus Volieren- und Käfighaltung (Versuch 1)

45 befruchtete, unbehandelte Bruteier wurden aus der Brüterei Süd, Regenstauf bezogen.

Sechs dieser Eier wurden unverzüglich zum Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München in Weihenstephan transportiert und bakteriologisch untersucht, während die restlichen 39 Bruteier an das Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München verbracht wurden.

Hier erfolgte die Bebrütung der Eier für 18 Tage im Inkubator sowie im Anschluss für 3 weitere Tage im Schlupfbrüter. Unmittelbar nach dem Schlupf (Zeitpunkt 0 h) wurden 3 Jungtiere getötet und Probenmaterial entnommen. Die verbliebenen 36 Küken wurden in 2 Gruppen zu je 18 Tieren unterteilt, wobei die erste Gruppe in eine Voliere mit Einstreu verbracht wurde, auf der zuvor Althennen lebten, so dass diese Tiere ein „physiologisches Inokulum“ erhielten. Diese Althenneneinstreu wurde, bevor sie den entsprechenden Küken zur Verfügung gestellt wurde, durch 3 Stichproben beprobt, unverzüglich zum Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München in Weihenstephan transportiert und dort bakteriologisch untersucht.

Die zweite „keimarm gehaltene“ Gruppe wuchs hingegen in desinfizierten Käfigen ohne Einstreu auf.

Beide Tiergruppen bekamen autoklaviertes kommerzielles Futter sowie autoklaviertes Trinkwasser mit Vitaminzusatz.

Die Probennahme erfolgte in der ersten Lebenswoche zu den in Tabelle 2 angegebenen Zeitpunkten. Hier wird auch beschrieben, welche Tiere welcher Haltungsform zugeordnet waren.

Tabelle 2: Probennahme-Schema und Zuordnung der Tiere (T1 – T51) zu den Versuchsgruppen

Zeitpunkt nach Schlupf (h)	Volierenhaltung	Käfighaltung
0		T1 ^x
		T2
		T3
6	T5	T9
	T6	T10
	T7	T11
12	T13	T17
	T14	T18
	T15	T19
24	T21	T25
	T22	T26
	T23	T27
48	T29	T33
	T30	T34
	T31	T35
72	T37	T41
	T38	T42
	T39	T43
168	T45	T49
	T46	T50
	T47	T51

^x die Tiere T1 - T3 wurden zum Zeitpunkt 0 h beprobt und werden daher beiden Haltungsformen (Volieren- und Käfighaltung) zugeordnet

2.2.2 Gruppe 3: Tiere aus Maststallhaltung (Versuch 2)

Die Probennahme erfolgte in der Brüterei Süd, Regenstauf sowie im beprobten Betrieb nach folgendem Ablauf:

Unmittelbar nach dem Schlupf entnahmen Mitarbeiter der Brüterei Eierschalen von 10 Tieren aus dem Brüter, dem die beprobten Tiere entstammten. Diese wurden der bakteriologischen Untersuchung zugeführt.

Die Küken wurden nun ebenfalls aus den Brütern entnommen, kontrolliert, verladen und zur Farm gebracht. 6 Jungtiere wurden nach Entnahme aus den Schlupfbrütern zur Probennahme getötet (Zeitpunkt 0 h), die weitere Beprobung erfolgte im Mastbetrieb.

Hier wurden zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 7 Tage, 21 Tage und 35 Tage nach dem Schlupf je 6 zufällig ausgewählte Tiere aus demselben Stallabteil zur Probennahme getötet. An Tag 21 erfolgte dies außerdem bei je 6 weiteren Tieren aus 2 anderen Abteilen, um den Einfluss von Faktoren aus der direkten Umwelt der Tiere zu ermitteln.

Darüber hinaus wurden Tupferproben aus Transportboxen, Futterproben (Starterfutter, Aufzuchtfutter 1, Aufzuchtfutter 2, Finisher) sowie Sammelproben vom Trinkwasser der Küken aus 10 Nippeln gewonnen und bakteriologisch untersucht.

2.2.3 Gruppe 4: Wildvögel (Versuch 3)

In Kooperation mit dem Arctic Centre, University of Lapland wurden im Rahmen der Jagdsaison Wildhühnern in Finnland (Gebiete Saarisuo und Nyrola) Kloakentupferproben (n = 20) entnommen. Es handelte sich hierbei um juvenile wie adulte Tiere weiblichen und männlichen Geschlechts.

2.3 Tierschutzrecht

Die Tierversuchsanzeige (Tötung zur Organentnahme) zur Beprobung der Tiere aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung erfolgte über das Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Wildvögel wurden bei der Jagd getötet und unterlagen somit nicht dem Tierversuchsrecht.

2.4 Probenbehandlung

2.4.1 Tiere aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung

2.4.1.1 Probengewinnung und Probentransport

Zunächst wurden die Tiere zufällig ausgewählt und *lege artis* durch Entbluten getötet. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Probennahme unter aseptischen Bedingungen. Hierzu wurde der Tierkörper in Rückenlage gebracht und seine Körperoberfläche mit 80 %igem Ethanol desinfiziert. Nun erfolgte die Durchtrennung der äußeren Haut in der Medianen mit sterilem Besteck. Nach Besteckwechsel wurde die Zölomhöhle eröffnet und die beiden Zäka entnommen.

Ein Blinddarm wurde ligiert und in ein 15 ml Falcontube mit Transportmedium (Standard 1 Bouillon) verbracht. Dabei wurde der Blinddarm so in das Röhrchen gehängt, dass der (lang belassene) Ligaturfaden mit dem Deckel festgeschraubt wurde und sein freies Fadenende aus dem Transportmedium hing.

Das Röhrchen war beim Transport senkrecht bei 4 °C gelagert, unmittelbar im Anschluss daran erfolgte die bakteriologische Untersuchung der Proben.

Auch der zweite Blinddarm wurde in ein 15 ml Falcontube gegeben und nach Transport in Flüssigstickstoff für die molekularbiologischen Untersuchungen asserviert.

2.4.1.2 Probenvorbereitung

Bakteriologische wie molekularbiologische Untersuchungen erfolgten für jede Probe in zwei getrennten Ansätzen, so dass zum einen die im Darmlumen befindlichen Bakterien und zum anderen die stark Mukosa-assoziierten Mikroorganismen erfasst wurden (Methode nach Gong *et al.*, 2002).

Hierzu wurden die Zäka aus dem Falcon-Tube jeweils in eine sterile Petrischale verbracht, ein 1 cm langes Darmstück ausgeschnitten und longitudinal eröffnet. Im Anschluss daran wurde das Darmstück in ein zuvor abgewogenes 2 ml Eppendorf-Röhrchen, gefüllt mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4, gepuffert), überführt und auf dem Vortexer verwirbelt. Das 2 ml Tube wurde erneut gewogen, die darin befindliche Lösung diente nun zur Untersuchung des Blinddarminhalts.

Das Darmstück wurde zwei weitere Male in 1 ml NaCl- Lösung sowie einmal in 1 ml 0,1 % Tween 80 gewaschen, um lose an der Darmwand haftende Bakterien zu entfernen. Anschließend wurde der Blinddarmausschnitt in ein ebenfalls abgewogenes Mikroreaktionsgefäß, gefüllt mit 1 ml 0,1 % Tween 80, verbracht und 20 min bei 18000 g zentrifugiert.

Nun wurde, nach erneutem wiegen des Eppendorf-Röhrchens, der Überstand abgenommen und das Darmstück mit 1,0 ml NaCl resuspendiert. Anhand dieser Suspension erfolgte die Untersuchung der stark Mukosa-assoziierten Bakteriengemeinschaft.

Zudem wurden Innendurchmesser und Umfang der Blinddarmausschnitte für jede Altersgruppe ermittelt und daraus Volumen und Fläche der untersuchten Darmausschnitte bestimmt.

2.4.2 Proben aus der Umwelt der Tiere

2.4.2.1 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Volierenhaltung

Bruteier

Die Vorbereitung der sechs Bruteier, welche zum selben Zeitpunkt aus derselben Brüterei bezogen wurden wie die Eier, aus denen später sowohl die Tiere aus Volieren- als auch die Küken aus Maststallhaltung schlüpften, erfolgte nach Schmied (2007). Hierzu wurden die Bruteier an der vorgesehenen Bruchstelle mit 90 %igem Ethanol desinfiziert und an der Kante eines sterilen Laborglases gebrochen. Die Eiinhalte und Schalen samt Schalenhaut wurden jeweils getrennt in sterile Homogenisierbeutel überführt und durch Handmassage der Beutel für ca. 30 sek durchmischt. Anschließend wurde je 1 g der Eischalen in ein steriles Laborglas verbracht, 9 ml physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4; gepuffert) zugefügt und für 30 min auf dem Schüttler (120 rpm) geschüttelt. Die so entstandene Spüllösung wurde der kulturellen bakteriologischen Untersuchung zugeführt. Zudem erfolgte die bakteriologische Untersuchung von je 1 g Eiinhalt.

Einstreu mit Dung von Althennen

Zur Untersuchung der Althennenstreu, die den Tieren aus Volierenhaltung zur Verfügung stand, wurde von jeder der drei gewonnenen Stichproben 1 g eingewogen, in 9 ml physiologische NaCl-Lösung verbracht und für 30 min auf

dem Schüttler geschüttelt. Die so entstandene Suspension wurde der kulturellen bakteriologischen und molekularbiologischen Untersuchung zugeführt.

2.4.2.2 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Käfighaltung

Bruteier

Die Vorbereitung der sechs Bruteier, welche zum selben Zeitpunkt aus derselben Brüterei bezogen wurden wie die Eier, aus denen später sowohl die Tiere aus Volieren- als auch die Küken aus Maststallhaltung schlüpften entsprach dem Vorgehen unter Punkt 2.4.2.1.

2.4.2.3 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Maststallhaltung

Eischalen

Unmittelbar nach dem Schlupf der Küken aus Maststallhaltung aus dem Schlupfbrüter gewonnene Eischalen wurden auf gleiche Weise wie die Schalen der Bruteier, geschildert unter Punkt 2.4.2.1 für die kulturelle bakteriologische Untersuchung vorbereitet.

Transportboxen

Drei der Transportboxen (Material: Pappe), in denen die konventionell aufgezogenen Küken von der Brüterei in den Maststall transportiert wurden, wurden vor dem Transport der Tiere zufällig ausgewählt und beprobt. Zur Probennahme wurde jeweils ein steriler Tupfer mäanderförmig über 10 cm² der Boxen gestrichen, in Transportmedium verbracht und der kulturellen bakteriologischen Untersuchung zugeführt. Hierzu wurden die Tupfer jeweils mit einer mit 80 %igem Ethanol abgeflamnten Schere abgeschnitten, in ein mit 1 ml physiologischer NaCl Lösung befülltes Polypropylen-Röhrchen verbracht und bei 120 rpm für 30 min auf dem Schüttler geschüttelt. Aus dieser Suspension erfolgte die bakteriologische Untersuchung.

Futter

Von den gewonnenen Futterproben (Starterfutter, Aufzucht – Futter 1, Aufzucht – Futter 2, Finisher) wurde je 1 g abgewogen, in 9 ml physiologische NaCl Lösung verbracht und für 30 min auf dem Schüttler bewegt. Die so entstandene Suspension wurde der kulturellen bakteriologischen Untersuchung zugeführt.

Trinkwasser

Aus zehn zufällig gewählten Nippeln im Maststall gewonnene Trinkwasserproben wurden zunächst gepoolt; hierzu wurde von jeder Probe nach deren gründlicher Durchmischung 1 ml in ein Polypropylen-Röhrchen verbracht. Im Anschluss erfolgte die kulturelle bakteriologische Untersuchung des Trinkwassers.

2.4.3 Wildvögel

2.4.3.1 Probengewinnung und Probenlagerung

Die Kloakentupferproben wurden Wildhühnern in Finnland mit sterilen Tupfern entnommen, anschließend in Cary-Blair-Medium verbracht per Luftfracht an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit gesendet und von dort an den Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München in Weihenstephan transportiert. Die Kühllhaltung erfolgte in einer handelsüblichen Kühlbox.

2.4.3.2 Probenvorbereitung

Die Tupfer wurden mit einer mit 80 %igem Ethanol abgeflamten Schere abgeschnitten, einzeln in jeweils mit 10 ml Peptonwasser befüllte Glasröhrchen verbracht und für 30 min auf dem Schüttler geschüttelt. Aus der entstandenen Suspension erfolgten kulturelle wie molekularbiologische bakteriologische Untersuchungen.

2.5 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchungen

2.5.1 Tiere aus Volieren-, Käfig-, und Maststallhaltung

2.5.1.1 Keimzahlbestimmung

Die quantitative Untersuchung der Blinddarmproben von Küken aus Volieren-, Käfig- sowie Maststallhaltung erfolgte mittels Oberflächen-Spatelverfahren nach Gedek (1974).

Hierzu wurden 0,1 ml der zuvor erstellten Probenlösungen nach gründlicher Durchmischung in 0,9 ml physiologischer NaCl Lösung suspendiert und auf diese Weise weiter diluiert, sodass Verdünnungsreihen mit dem Faktor 1:10 von 10^{-1} bis 10^{-11} entstanden. 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden anschließend auf verschiedenen Nährböden (Auswahl nach Hölzel, 2006) ausplattiert. Die

verwendeten Anzuchtmedien sind in Tabelle 3 dargestellt. Der Blutagar diente zur Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl, außerdem kann anhand dieses Nährbodens das Hämolyseverhalten von Bakterien beurteilt werden. Die Bestimmung der anaeroben mesophilen Gesamtkeimzahl erfolgte auf Schaedler-Agar, der auch zur Kultivierung anspruchsvoller anaerober Mikroorganismen geeignet ist (Schaedler *et al.*, 1965). Durch Zugabe von Schafblut und Vitamin K wird das Wachstum obligater Anaerobier auf diesem Medium gefördert. Gassner-Agar ist ein Selektiv-Agar, der zur Kultivierung von Enterobacteriaceae und der Bestimmung ihrer Keimzahlen zur Anwendung kam. Der Nährboden enthält Metachromgelb, welches vor allem zur Hemmung der grampositiven Begleitflora dient, sowie Laktose, deren fermentative Metabolisierung den zugegebenen pH-Indikator Wasserblau von farblos nach tiefblau umschlagen lässt. Dementsprechend stellen sich Laktose-positive Keime auf diesem Medium blau dar und färben auch den umgebenden Agar blau. Findet hingegen kein Laktose-Abbau statt, wird das Wasserblau im nun alkalischen Bereich farblos und die gelbe Farbe des Metachromgelb zeigt sich (Gassner, 1918). So ist mit Hilfe dieses Nährmediums eine Unterscheidung der Enterobakterien in Laktose-positiv und Laktose-negativ möglich. Auf LAMVAB-Agar (*Lactobacillus* anaerobic MRS mit Vancomycin und Bromkresol-Grün Agar) können Laktobazillen kultiviert werden (Hartemink *et al.*, 1997). Zum einen werden durch den niedrigen pH-Wert dieses Nährbodens Konkurrenzkeime (z. B. Enterobakterien, Clostridien) gehemmt, zum anderen wird durch das zugegebene Vancomycin (20 mg/l) die Vermehrung weiterer Mikroorganismen wie Bifidobakterien und Enterokokken unterdrückt und so letztendlich das Wachstum Vancomycin resistenter Laktobazillen ermöglicht. CATC-Agar (Citrate-Azide-Tween-Carbonate Agar) ist ein Selektivagar, der zur Bestimmung der Enterokokken-Keimzahl genutzt wurde. Sein Wirkungsprinzip beruht darauf, dass hohe Konzentrationen an Azid und Citrat die Begleitflora nahezu vollständig hemmen, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid ist ein farbloser Redox-Indikator, welcher im oxidierten Zustand (Tetrazolium) farblos ist und sich in reduziertem Zustand (Formazan) rot darstellt. Bei einem pH-Wert von 7, den der CATC-Agar aufweist, reduzieren die meisten *Enterococcus* spp. Tetrazolium zu Formazan, wodurch sich die entsprechenden Bakterienkolonien mit einer roten Färbung auf dem Medium zeigen (Reuter, 1992).

Nach Inkubation der beimpften Medien bei 37 °C für 48 h (Bebrütung von Schaedler-Agar und LAMVAB-Agar unter anaeroben Bedingungen) wurden je Verdünnungsreihe und Nährbodenart mindestens zwei Agarplatten aufeinanderfolgender Verdünnungsstufen ausgezählt. Nun konnte der durchschnittliche Keimgehalt der Probenansätze berechnet werden, indem die ausgezählte Koloniezahl mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert und im Anschluss der gewichtete Mittelwert aus beiden ausgezählten Platten gebildet wurde. Keimzahlen werden in koloniebildenden Einheiten (KbE) pro cm³ Darmvolumen (für das Darminhalt-assoziierte Mikrobiom) bzw. pro cm² Darmgrundfläche (für das Mukosa-assoziierte Mikrobiom) angegeben.

Tabelle 3: Anzuchtmedien zur bakteriologischen Untersuchung sowie ausplattierte Verdünnungsstufen je Nährboden

Verwendung	Nährmedium	Verdünnungsstufen
Keimgehalt, aerob	Blutagar	10 ⁻¹ bis 10 ⁻¹¹
Keimgehalt, anaerob	Schaedler-Agar mit Vit. K1 und Schafblut	10 ⁻¹ bis 10 ⁻¹⁰
<i>Enterobacteriaceae</i>	Gassner-Agar	10 ⁻¹ bis 10 ⁻¹¹
<i>Enterococcus spp.</i>	CATC-Agar	10 ⁻¹ bis 10 ⁻⁸
„Laktobazillen“	LAMVAB-Agar	10 ⁻¹ bis 10 ⁻⁸

2.5.1.2 Keimisolation und Keimidentifizierung

Nach der quantitativen Analyse erfolgte die qualitative Beurteilung der Primärkultur. Hierzu wurden die auf den unterschiedlichen Agarplatten gewachsenen Kolonien nach ihrer Größe, Form, Oberflächenstruktur und Pigmentierung morphologisch beschrieben. Anschließend wurde von jedem unterschiedlichen Phänotyp eine Einzelkolonie selektiert, mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf den geeigneten Medien subkultiviert und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Die gewonnenen Subkulturen wurden durch biochemische Tests sowie mittels MALDI-TOF-MS näher charakterisiert. Dabei verzweigte sich das Differenzierungsschema je nach Keimart auf unterschiedliche Weise. Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der dabei angewandten Methoden.

Tabelle 4: Differenzierung der einzelnen Keimgruppen

Subkulturen	kultiviert auf	untersucht mit/auf
Aerobier	Blutagar	Gramfärbung, Hämolyse, Katalasetest, Oxidasetest, Indoltest, MALDI-TOF-MS
obligate Anaerobier	Schaedler, Blutagar	bei obligat anaerobem Wachstum: Gramfärbung, Hämolyse, Katalasetest, Oxidasetest, Indoltest, MALDI-TOF-MS
Coliforme	Normalagar, Fluorocult	Lactosemetabolismus, Oxidasetest, Indoltest, Fluoreszenz auf Fluorocult-Agar (β -D-Glucuronidase), MALDI-TOF-MS
Laktobazillen	MRS-Agar	Gramfärbung, Katalasetest, MALDI-TOF-MS
Enterokokken	CATC-Agar	Gramfärbung, Hämolyse, Katalasetest, Zuckermetabolismus (Säureproduktion aus Xylose, Mannitol, Arabinose, Natriumpyruvat), MALDI-TOF-MS

Untersuchung von Aerobiern

Auf Blutagar aerob gewachsene Keime wurden zunächst den in Tabelle 4 aufgeführten Tests unterzogen. Hieran schloss sich die Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS an.

Untersuchung von Enterobacteriaceae

Zur Identifizierung der *Enterobacteriaceae* wurden diese auf ihre Fähigkeit zur Laktoseverstoffwechslung auf Gassner-Agar getestet. Durch Subkultivierung auf Fluorocult-Agar wurde anschließend die Bildung von β -D-Glucuronidase überprüft. Nahezu alle *E. coli* bilden β -Glucuronidase, die Glucuronsäure vom 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid abspaltet, wobei das fluoreszierende Aglucon entsteht. Infolge dessen zeigen Mikroorganismen, die die β -D-Glucuronidase exprimieren, unter UV-Licht auf Fluorocult-Agar blaue Fluoreszenz. Die Isolate wurden außerdem zu ihrer näheren Charakterisierung der Gram-Färbung sowie Oxidase- und Indoltest unterzogen. Konnten Keime aufgrund dieser Merkmale nicht eindeutig als *E. coli* identifiziert werden erfolgte ihre nähere Bestimmung mittels MALDI-TOF-MS Technologie.

Untersuchung von Enterokokken

Aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung als potentielle *Enterococcus* spp. identifizierte Isolate wurden zur Speziesbestimmung Zuckertests unterzogen

(nach Bejuk *et al.*, 2000). Hierzu wurde die Beimpfung von jeweils 5 ml Natrium-Pyruvat-, Arabinose-, Xylose- und Mannitol-Lösung (Phenolrot als Indikator zugesetzt) mit je einer Öse Keimmateriale aus Einzelkolonien vorgenommen. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexer und 24 stündiger Bebrütung der Suspensionen bei 37 °C erfolgte die Beurteilung des Zuckermetabolismus der Keime. Der zugesetzte Indikator Phenolrot stellt sich im sauren Bereich gelb dar, somit wurde bei der Evaluierung der Zuckerverstoffwechslung durch *Enterococcus* spp. ein Farbumschlag von rot nach gelb als positives Ergebnis gewertet. Anhand des Zuckerprofils wurden die untersuchten Enterokokken näher bestimmt (nach Bejuk *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden die Enterokokken-Isolate mittels MALDI-TOF-MS Technologie bestätigt.

Untersuchung von obligat anaeroben Keimen

Subkulturen von Mikroorganismen, welche zunächst unter anaeroben Bedingungen auf Schaedler-Agar gewachsen sind, wurden in der Folge sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen bebrütet, um fakultativ anaerobe Keime auszuschließen. Gramfärbung, Katalase-, Oxidase- und Indoltest schlossen sich bei obligat anaeroben Isolaten an und ließen eine Identifizierung von Keimen der Gattung *Clostridium* zu. Außerdem wurden sämtliche obligaten Anaerobier, die auf die oben geschilderte Weise isoliert und identifiziert werden konnten, der näheren Charakterisierung durch MALDI-TOF-MS Technologie zugeführt.

Untersuchung von Laktobazillen

Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS wurden Isolate, die auf LAMVAB-Agar anzüchtbar waren, näher bestimmt.

2.5.1.3 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Zur genaueren Keimbestimmung der Bakterienisolate wurde die in den 1980er Jahren von Hillenkamp & Karas entwickelte Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) Methode herangezogen (Karas *et al.*, 1985).

Die gewonnenen Isolate wurden nach Freiwald und Sauer auf die massenspektrometrische Messung vorbereitet (Freiwald & Sauer, 2009):

Zunächst wurde die Matrix erstellt. Hierfür können verschiedene niedermolekulare aromatische Säuren, hier α -Cyano-Hydroxyzimtsäure, eingesetzt werden, die in der Lage sind, die Energie des eingesetzten Lasers zu absorbieren. Neben der Energieübertragung hat die Matrix die Aufgabe, die zur Ionisierung der Analytmoleküle notwendigen Protonen zur Verfügung zu stellen (Sauer, 2010). Zur ihrer Herstellung wurde aus 500 μ l Acetonitril, 25 μ l reiner Trifluoressigsäure und 475 μ l Aqua dest. 1 ml Organic Solvent Lösung (OS) angefertigt und darin 14 mg Zimtsäure durch gründliches vortexen in Lösung gebracht. Nach einer Wartezeit von ca. 5 min, die dazu dient, dass sich Kristalle der leicht übersättigten Lösung am Boden absetzen, wurde die nun gebrauchsfertige Matrix in Portionen von 0,25 ml aliquotiert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur für maximal 2 Wochen aufbewahrt.

Nun folgte der Probenauftrag, für den eine geringe Menge Keimmaterial (ca. 10^4 bis 10^6 Bakterien sind ausreichend) aus Einzelkolonien mit Hilfe eines autoklavierten Zahnstochers vom Nährboden abgenommen, als dünner Film auf eine ca. 6 mm durchmessende Analysenposition des metallischen Trägers (Target) aufgetragen und sodann mit 1 μ l der Matrix überschichtet wurde. Durch Trocknung an der Luft bei Raumtemperatur entsteht so eine kristalline Probe, bei der die Makromoleküle des Analyten in die kleinen Matrixmoleküle eingelagert sind. Auf jeder der hier verwendeten Targetplatten befanden sich 96 Probenfelder, die pro Messung analysiert werden konnten. Eine Position jeder Target-Platte wurde mit je 1 μ l Bacterial-Test-Standard bestückt.

Im Anschluss konnte die Messung im MALDI-TOF MS durchgeführt werden, bei der die Probe im Hochvakuum mit kurzen Laserimpulsen (3 ns, 337 nm) beschossen wird. Die Energie dieses Laserlichtimpulses wird von der Matrix absorbiert, wodurch sich Moleküle aus der Kristalloberfläche herauslösen und dabei Analytmoleküle mitreißen, sodass beide in die Gasphase übergehen (Desorption). Es kommt zur Kollision der neutralen Analyt- mit den protonierten Matrixmolekülen, bei der durch Ladungsübertragung die Ionisierung der Analytmoleküle (hier bakterielle Proteine) stattfindet. Diese bleiben dabei intakt („sanfte Ionisierung“). Durch Protonierung z. B. von basischen Aminogruppen der Bakterienproteine entstehen vor allem einfach positiv geladene Ionen (Yang, 2013). Im Flugrohr definierter Länge werden die gebildeten Ionen durch ein starkes elektromagnetisches Feld, das von einer Hochspannungsquelle (10-30 kV)

erzeugt wird, im Vakuum in Richtung Kathode (Detektor) beschleunigt. Aufgrund unterschiedlicher Masse und verschiedenem Ionisierungsgrad der Proteine passieren diese das Flugrohr mit individueller Geschwindigkeit und erreichen so den Detektor, der die geladenen Makromoleküle nach unterschiedlichen Flugzeiten (time-of-flight) registriert. Dadurch lassen sich die unterschiedlichen Massen der einzelnen Analyten bestimmen und durch Kalibrierung des Systems mit Ionen bekannter Masse kann das Massenspektrum der detektierten Probe ermittelt werden (Wieser *et al.*, 2012). Massenspektren ganzer Bakterienzellen weisen artspezifische und reproduzierbare Peaks auf und stellen so als „molekularer Fingerabdruck“ die Grundlage der MALDI-TOF-MS Differenzierung dar. Dabei handelt es sich vor allem um Massensignale von ribosomalen Proteinen (Massenbereich 2 bis 20 kDa). Diese Proteine liegen relativ unabhängig vom physiologischen Status der Zelle in hohen Konzentrationen vor und ihre Aminosäuresequenzen sind hochkonserviert. So können sie als Biomarker zur Speziesbestimmung genutzt werden. (Wieser *et al.*, 2012).

Die ermittelten Spektren werden mit einer im System integrierten Referenzdatenbank verglichen, die automatisierte Auswertung der Daten erfolgt in einem Zahlenwert (*score*), der Aufschluss über die Validität des Differenzierungsergebnisses gibt. Dabei wird ein Score-Wert über 2,0 als korrekte Speziesidentifizierung angesehen, bei einem Wert über 1,7 kann eine Aussage auf Gattungsebene getroffen werden (Freiwald & Sauer, 2009).

2.5.1.4 Kryokonservierung

Sämtliche Subkulturen wurden vor ihrer Kryokonservierung nochmals subkultiviert, für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -70 °C eingefroren. Hier diente als Medium für Laktobazillen MRS-Bouillon, für alle anderen Keime Nutrient Broth. Beide Nährmedien enthielten einen kryoprotektiven Glycerinzusatz (20 bzw. 15 %).

2.5.1.5 Prüfung der Antibiotikaresistenz

E. coli, *Enterococcus faecium* sowie *Enterococcus faecalis*-Isolate aus Blinddarminhalt und zäkaler Mukosa der beprobten Hühner wurden auf ihre Sensibilität gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen durch Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) mittels Mikrodilutionsverfahren

unter Anwendung des Micronaut®-Testsystems untersucht. Die Auswahl der hierbei eingesetzten Antibiotika erfolgte nach Hölzel (2006) insbesondere in Bezug auf ihre humanmedizinische Relevanz und umfasste außerdem in der Veterinärmedizin häufig eingesetzte Substanzen.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Isolate auf Blutagar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurden je 3-5 Kolonien mit einem sterilen Tupfer vom Nährboden abgenommen und in 5 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung (pH 5,9-6,4) überführt, um so eine Bakteriensuspension mit einem McFarland- Trübungsstandard von 0,5 zu erstellen. Aus dieser Suspension wurden wiederum 50 µl (*E. coli*) bzw. 100 µl (*Enterococcus* spp.) in 13 ml kation-adjustierte Müller-Hinton-Bouillon (CAMHB) pipettiert, wodurch eine Bakteriensuspension mit einer annähernden Keimkonzentration von 4×10^5 (*E. coli*) bzw. 8×10^5 (*Enterococcus* spp.) entstand. Mit Hilfe eines Dispensierautomaten wurde diese Flüssigkeit in die Kavitäten der mit antimikrobiellen Wirkstoffen unterschiedlicher Konzentration vorbeschichteten Mikrotiterplatten gegeben und diese nach Versiegeln mit industriereiner Klebefolie auf dem Schüttler (350 rpm) bei Raumtemperatur für 5 min geschüttelt. Um die Reinheit der beimpften CAMHB zu überprüfen wurde diese nach dem Pipettievorgang auf Blutagar ausgestrichen und die Nährbodenplatte nach 24 h Bebrütung bei 37 °C beurteilt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C erfolgte die visuelle Auswertung der Mikrotiterplatten, wobei Trübung innerhalb einer Kavität Wachstum des untersuchten Isolats bei der jeweiligen Antibiotikakonzentration anzeigte. Bei Prüfung der Enterokokken-Isolate galt es dabei das sogenannte „Trailing-Phänomen“, d. h. ein Bakterienwachstum von bis zu 20 % der Positiv-Kontrolle in allen Vertiefungen des Panels, zu erfassen. Entsprechendes Wachstum wurde notiert, jedoch bei der Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration nicht als positiv (bewachsen) gewertet.

2.5.2 Proben aus der Umwelt der Tiere

Aus den wie unter Punkt 2.4.1.2 hergestellten Suspensionen von Proben aus der Umwelt von Tieren aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung wurden jeweils Verdünnungsreihen mit dem Faktor 10 erstellt. Keimzahlbestimmung, Keimisolation und -identifizierung sowie Kryokonservierung erfolgten anschließend wie unter Punkt 2.5.1.2 und 2.5.1.4 dargestellt. Die Keimzahlen

werden hierbei in KbE pro g (für Eischale, Eiinhalt, Althennenstreu), KbE pro ml (Trinkwasser) bzw. KbE pro 10 cm² Fläche (für Transportboxen) angegeben.

2.5.3 Wildvögel

Nach der wie unter Punkt 2.4.3.2 beschriebenen Probenvorbereitung wurden aus den entstandenen Suspensionen Verdünnungsreihen mit dem Faktor 10 erstellt. Da für die Kloakentupferproben kein quantitativer Bezug hergestellt werden kann erfolgte deren Untersuchung ausschließlich hinsichtlich ihrer qualitativen mikrobiellen Zusammensetzung. Keimisolation und -identifizierung sowie Kryokonservierung wurden wie unter Punkt 2.5.1.2 und 2.5.1.4 beschrieben durchgeführt.

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

2.6.1 Polymerase-Chain-Reaction-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (PCR-SSCP)

Die PCR-SSCP-Technik wurde ursprünglich in der Medizin als Methode zur Mutationsanalyse entwickelt (Orita *et al.*, 1989) und später zu einem molekularbiologischen Fingerprintverfahren, mit dem die Diversität mikrobiologischer Gemeinschaften in unterschiedlichen Probenmaterialien untersucht werden kann, weiterentwickelt (Schwieger & Tebbe, 1998). Dabei werden zur Analyse von Bakteriengemeinschaften, nach Extraktion der gesamten DNA einer Probe, zunächst in der PCR so genannte „universelle Primer“ eingesetzt, die an stark konservierte Bereiche von bakteriellen 16S rRNA codierenden Gene binden. Die amplifizierte DNA-Fragmente sind dann bei allen Bakterien nahezu gleichlang, können sich jedoch in ihrer Basensequenz unterscheiden, was zur Differenzierung der Organismen genutzt wird (Schwieger & Tebbe, 1998). Gene, die die ribosomale RNA codieren, sind aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und ihrer phylogenetischen Konserviertheit als phylogenetische Marker besonders gut geeignet. (Olsen *et al.*, 1986). Da im SSCP-Gel DNA-Einzelstränge analysiert werden, muss die doppelsträngige (ds) DNA der PCR Produkte zunächst mit Hilfe der Lambda-Exonuclease (deren Ansatzpunkt die Phosphorylierung des Reverse-Primers ist) in Einzelstrang-DNA (ss) überführt werden. So werden Heteroduplices, die durch Rehybridisierung von Einzelsträngen unterschiedlicher Organismen bei der PCR entstehen können, aus der nachfolgenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese ausgeschlossen (Schwieger

& Tebbe, 1998). Die Einzelstränge falten sich in Abhängigkeit ihrer Nucleotidabfolge und sich daraus ergebenden intramolekularen Basenpaarungen und bilden so unterschiedliche Sekundärstrukturen aus. Nach diesen Konformationen werden sie nun bei der nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und schließlich durch Färbung mit Silbernitrat (nach Bassam *et al.*, 1991) in Form einzelner Banden sichtbar gemacht. Da es sich hierbei um eine nicht-denaturierende Methode handelt, können diese im Anschluss der Sequenzierung zugeführt werden. So erhält man den genetischen Fingerabdruck der Bakteriengemeinschaft einer Probe.

Mit Hilfe der PCR-SSCP-Technik wurden Proben von Küken aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung sowie Kloakentupferproben von Wildhühnern aus natürlichem Habitat untersucht. Zudem erfolgte anhand dieser Methode die Analyse der Einstreu mit Dung von Althennen, welche den Tieren aus Volierenhaltung zur Verfügung stand.

2.6.1.1 DNA-Extraktion

Die Zäkumproben der Küken aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung wurden jeweils in zwei getrennten Ansätzen – einmal für den Zäkuminhalt und einmal für das Mukosa assoziierte Mikrobiom – analysiert. Die Extraktion der Gesamt-DNA erfolgte mit Hilfe des Power Soil™ (Darminhalt, Einstreu mit Dung von Althennen) bzw. des Blood & Tissue® (Mukosa) Extraktionskits nach den in Abbildung 4 und Abbildung 5 dargestellten Protokollen. Die DNA aus Kloakentupferproben von Schneehühnern wurde mittels CTAB-Methode (nach Korthals *et al.*, 2008a) extrahiert, das angewandte Protokoll findet sich in Abbildung 6.

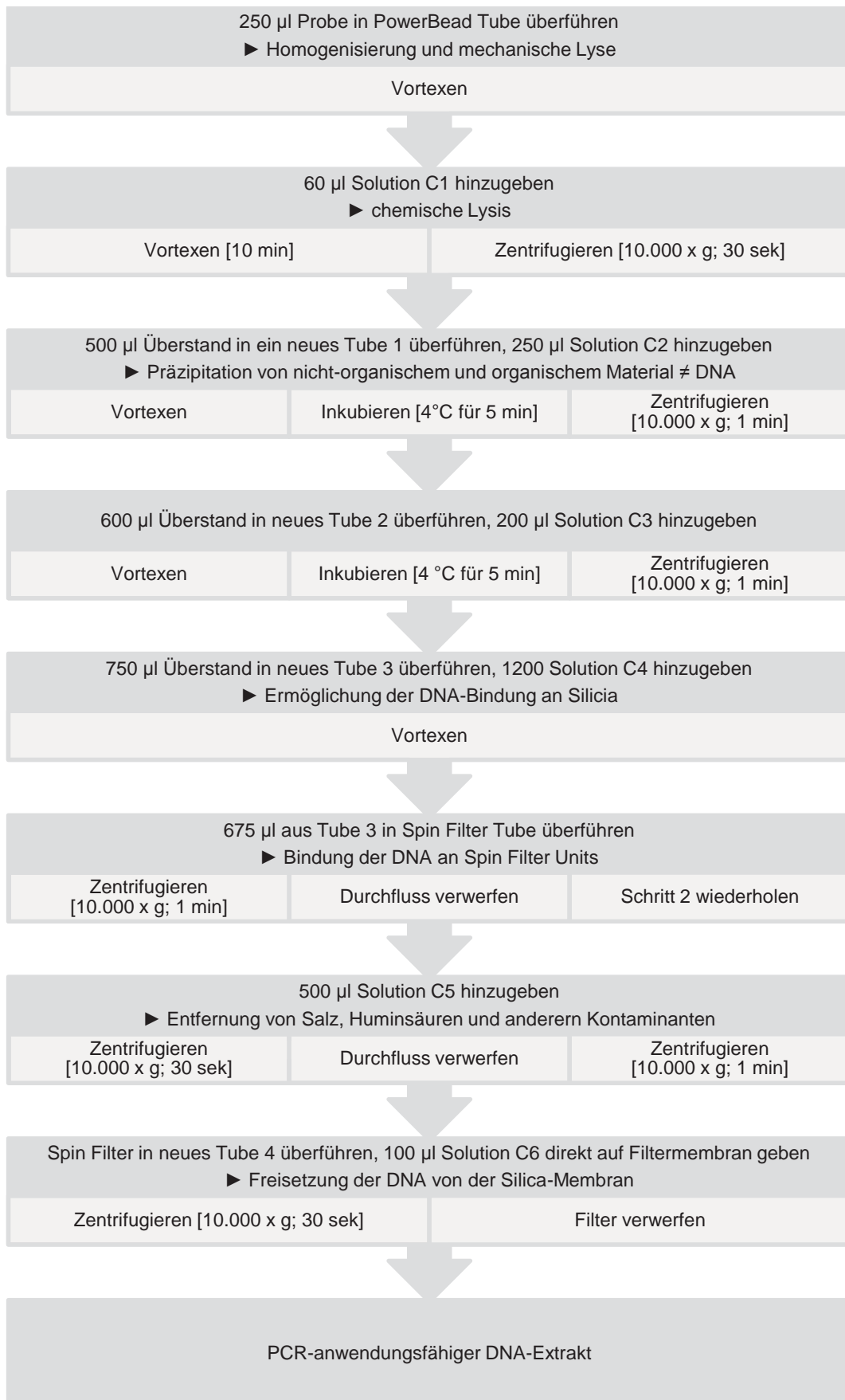


Abbildung 4: Ablauf der DNA-Extraktion mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit

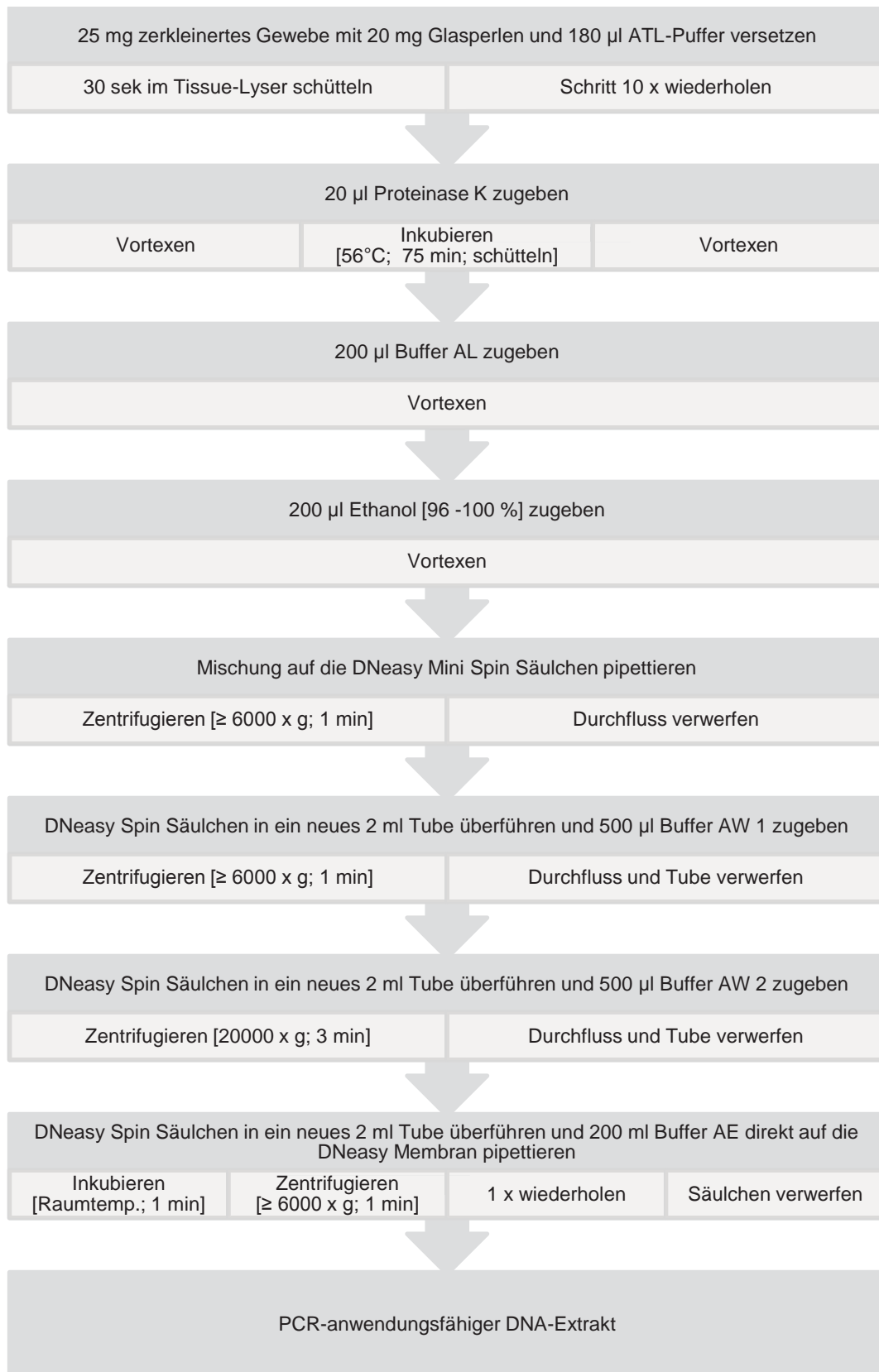


Abbildung 5: Ablauf der DNA-Extraktion mittels DNeasy® Blood & Tissue Kit

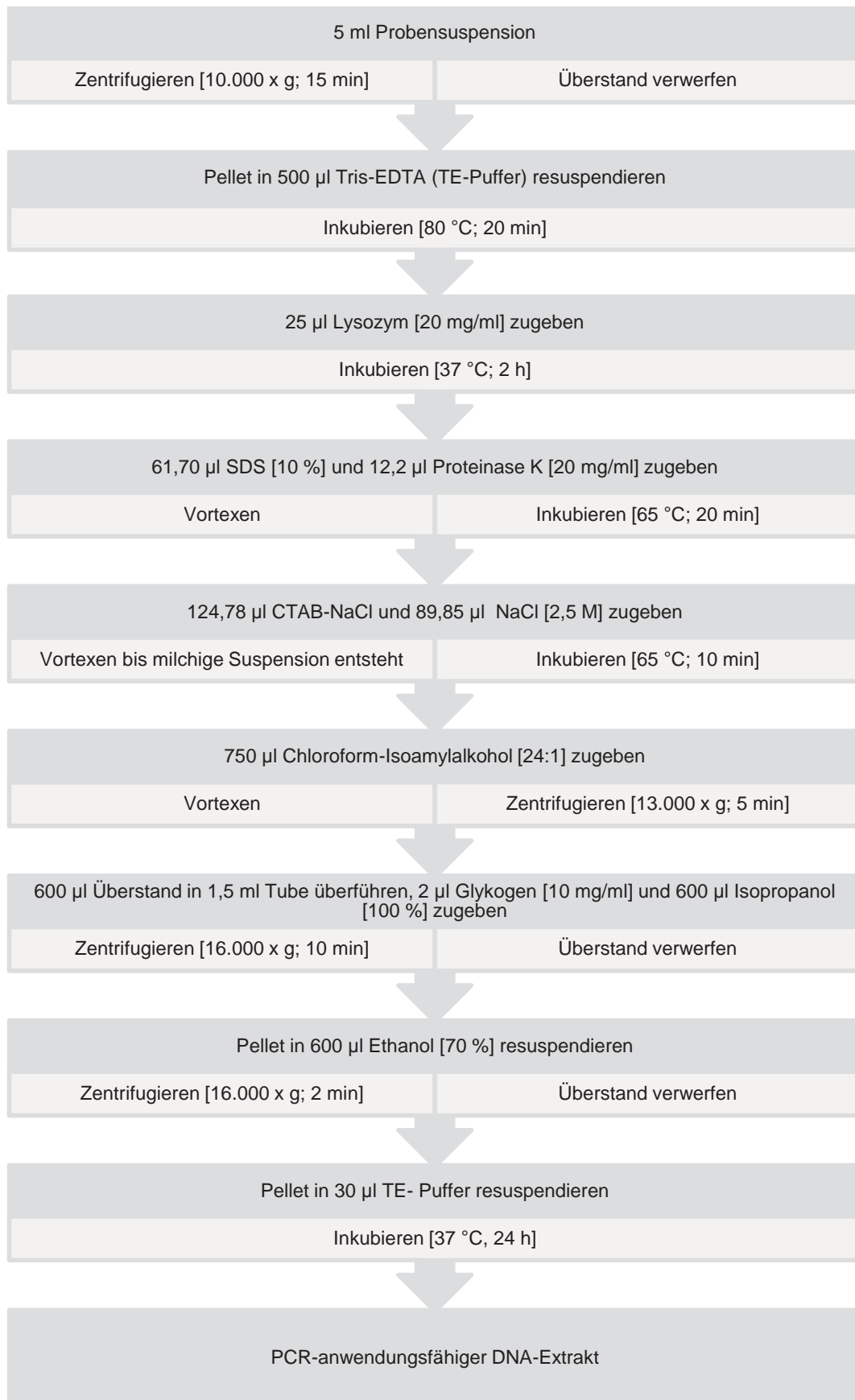


Abbildung 6: Ablauf der DNA-Extraktion mit CTAB (nach Korthals *et al.*, 2008a; mit Modifikationen)

2.6.1.2 PCR

Mit Hilfe der „Com-PCR“ wurde zunächst eine Gensequenz codierend für die 16S rRNA von Bakterien amplifiziert. Die Primer Com1 und Com2-Ph binden dabei an konservierte Regionen der 16S rRNA-Gene und rahmen ein 407 bp langes Fragment in den variablen Regionen V4 und V5 ein (Schwieger et al., 1998).

Pro PCR-Ansatz wurden jeweils 24 µl Mastermix und 1 µl Template eingesetzt. Um genügend DNA-Material für die späteren Schritte zu erhalten, erfolgte die PCR im Dreifachansatz, außerdem wurde bei jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle mit DNA-freiem Wasser anstatt Template sowie eine Positivkontrolle bestehend aus der DNA eines bekannten Keimes mitgeführt, um die korrekte Durchführung des Laufs zu kontrollieren. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung der Reagenzien für den PCR-Einzelansatz, in Tabelle 6 ist das verwendete Thermocycler-Programm dargestellt.

Tabelle 5: Reagenzien für den PCR-Ansatz der „Com-PCR“

Reagenzien	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	20,375
10x Puffer inkl. 15 mM MgCl ₂	2,5
dNTPs [je 10 mM]	0,5
com 1 forward Primer [50 µM]	0,25
com 2-ph reverse Primer [50 µM]	0,25
HotStar Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,125
DNA-Template	1
Gesamtvolumen	25

Tabelle 6: Thermocyclerprogramm für die „Com-PCR“

PCR-Ablauf	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Einleitende Denaturierung	95	900	
Denaturierung	94	60	} 30 Zyklen
Annealing	50	60	
Elongation	72	70	
Terminale Elongation	72	300	

2.6.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der DNA-Amplifikation wurde eine horizontale Gelelektrophorese in 1 %igem Agarosegel, bestehend aus 1 g Agarose, 100 ml 0,5 x TBE-Puffer und 3,6 µl Ethidiumbromid, durchgeführt. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA ein, so kann diese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. 8 µl des PCR-Produktes und 2 µl Ladepuffer wurden in die Taschen des Agarosegels pipettiert, die beiden äußeren Geltaschen wurden mit 10 µl eines 100 bp DNA Ladders als Größenstandard bestückt. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V über 45 min in 0,5 x TBE-Puffer.

2.6.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von den Primerpaaren und den restlichen Bestandteilen zu reinigen, wurden die drei PCR-Ansätze gepoolt und anschließend eine Aufreinigung mittels GenElute PCR-Clean-Up Kit von Sigma nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Protokoll ist in Abbildung 7 dargestellt.

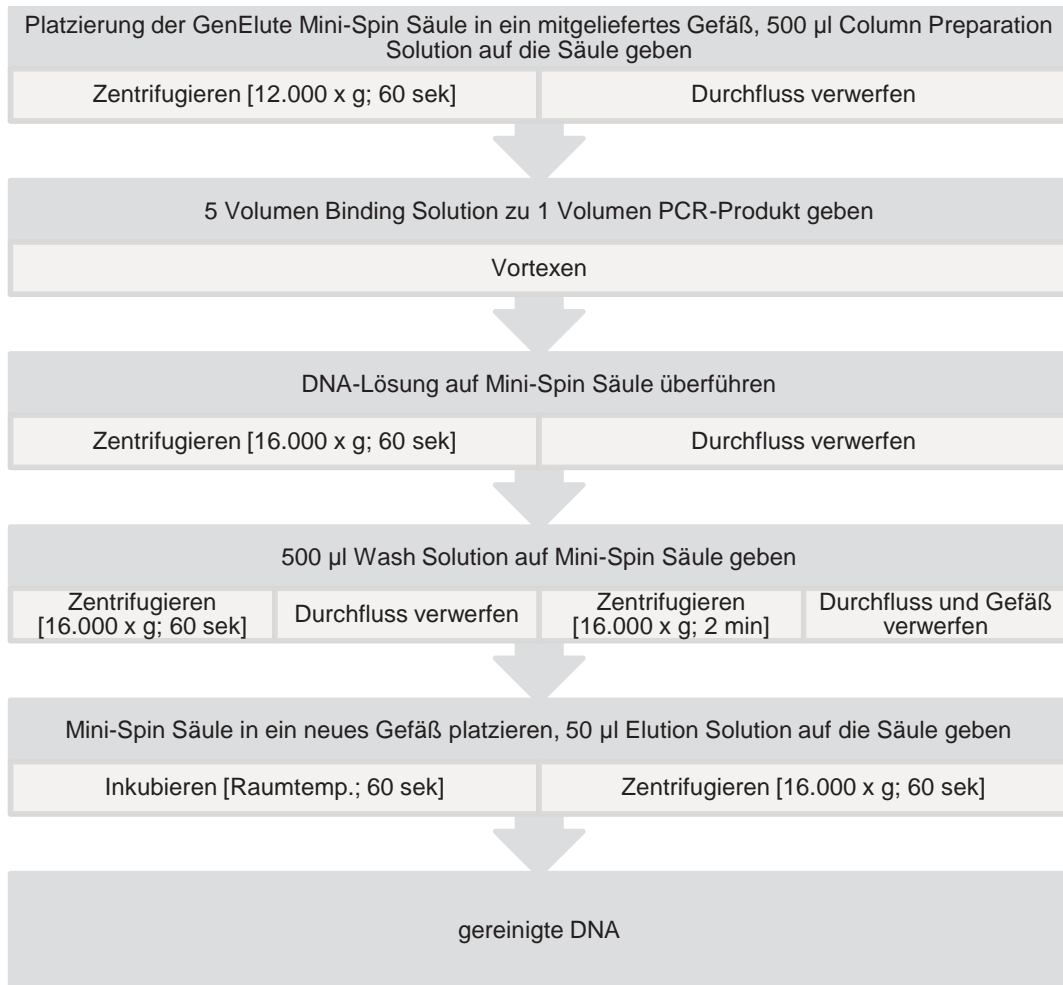


Abbildung 7: Ablauf der Aufreinigung von PCR-Produkten mittels GenElute™ PCR Clean-up Kit

2.6.1.5 Messung der DNA-Konzentration

Um die Proben im SSCP-Gel besser vergleichbar zu machen, wurde ihr DNA-Gehalt auf eine einheitliche Konzentration eingestellt. Hierzu erfolgte zunächst die Quantifizierung der DNA-Konzentration in den gereinigten PCR-Produkten mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer. Je 1 µl Probe wurde auf den unteren Messsockel des Geräts pipettiert, welches die DNA-Konzentration auf Basis von Lichtabsorption misst. Des Weiteren wird das Absorptionsverhältnis von 260/280 nm ermittelt, das bei einem Wert von $\geq 1,8$ liegen sollte, da so eine genügend hohe Reinheit der DNA gewährleistet ist. Anschließend wurden die Proben mit Nuklease-freiem Wasser auf eine DNA-Konzentration von 400 ng in 26 µl verdünnt.

2.6.1.6 Lambda-Exonuklease-Verdau

Da im SSCP-Gel DNA-Einzelstränge analysiert werden, müssen die vorliegenden Doppelstränge zunächst in Einzelstränge überführt werden. Dies geschieht mit Hilfe der Lambda-Exonuclease, eine DNase die am Phosphatrest des Reverseprimers ansetzt und den phosphorylierten Strang in 5'-3' Richtung selektiv abbaut. Für die Durchführung des Verdaus wurde den jeweils auf 400 ng/26 µl eingestellten PCR-Produkten 14 µl eines zuvor erstellten Mastermixes (Tabelle 7) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 7: Reagenzien für den Lambda-Exonukleaseverdau

Reagenzien	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	9,5
λ-Exonuklease-Puffer, 10x	4,0
λ-Exonuklease [5 U/µl]	0,5
PCR-Produkt [400 ng]	26
Gesamtvolumen	40

2.6.1.7 Aufreinigung der einzelsträngigen DNA

Nach der Überführung in Einzelstränge wurde die DNA erneut gereinigt, um den Verdau zu stoppen und das Enzym sowie entstandene Abbauprodukte zu entfernen. Im Unterschied zur ersten Aufreinigung der PCR-Produkte wurde die DNA nun mit 20 µl Elution Solution eluiert, ansonsten erfolgte dieser zweite Reinigungsschritt wie unter Punkt 2.6.1.4 dargestellt.

2.6.1.8 Herstellung des Polyacrylamidgels

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurden zunächst zwei Glasplatten mit Ethanol (70 %) gereinigt und anschließend zweimal im Abstand von ca. 10 min beschichtet. Dabei wurden jeweils 2 ml Bind Silane auf die Trägerplatte gegeben, um das Anhaften des Gels zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu erfolgte die Behandlung der zweiten Glasplatte mit jeweils 2 ml Repel Silane, um später ein Ablösen dieser Platte vom Gel zu ermöglichen. Während die Beschichtung antrocknete wurde die Elektrophoresekammer, in die nun die beiden Glasplatten getrennt durch einen Spacer eingespannt werden konnten, nach Angaben der Firma Peqlab zusammengebaut.

Für die Herstellung der Lösung für das 31,3 %ige Polyacrylamidgel wurden destilliertes Wasser, 10 x TBE und 2 x MDE gemischt, durch einen 0,45 µm Filter filtriert und TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben. Unter Vermeidung von Blasenbildung wurde die Gellösung zwischen die beiden Glasplatten gegossen und ein Kamm zur Taschenbildung im noch flüssigen Gel positioniert. Nach ca. 1,5 h war das Gel bei Raumtemperatur auspolymerisiert und konnte nun in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese im Anschluss mit 1 %igem TBE-Puffer befüllt werden. Nach Entfernen des Kamms wurden die Taschen mit 1 %igem TBE-Puffer gespült um Gelreste zu entfernen.

Zwischenzeitlich wurde die aufzutragende, gereinigte DNA mit 9 µl SSCP-Auftragspuffer versetzt, im Thermoblock 5 min bei 95 °C inkubiert und für 10 min auf Eis gestellt. Dieser Schritt dient dazu, Fehlfaltungen der Einzelstränge aufzuheben und ihre natürliche Faltung herzustellen. Nun konnten die Taschen des Gels mit jeweils 8 µl der Proben und dem Speziessstandard, welcher zur Laufweitenkontrolle eingesetzt wurde, beladen werden. Die Trennung der DNA-Einzelstränge erfolgte bei einer Spannung von 400 V und einer kontrollierten Temperatur von 20 °C über einen Zeitraum von 16 h.

2.6.1.9 Färben des SSCP-Gels mit Silbernitrat

Nach abgeschlossener Elektrophorese und vorsichtiger Trennung der beiden Glasplatten erfolgte die Silbernitrat-Färbung des SSCP-Gels nach Bassam et al. (1991), um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen.

Hierfür wurde die mit dem Gel behaftete Platte in einer Wanne mit 10 %iger Essigsäure bei 20 rpm für 30 min auf dem Schüttler bewegt und anschließend drei Mal für jeweils 5 min bei 20 rpm mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun folgte die Färbung in 500 ml frisch angesetzter Färbelösung für 30 min unter Lichtabschluss ebenfalls auf dem Schüttler. Nach abschütten der Färbelösung wurde das Gel erst mit destilliertem Wasser abgespült und dann nochmals für 20 sek in Aqua dest. geschwenkt. Nun wurde das Gel kurz mit Entwicklerlösung überspült (um Silbernitratreste zu entfernen) und dann bis zur gewünschten Farbintensität in Entwicklerlösung geschwenkt. Um den Entwicklungsprozess zu stoppen, wurde das Gel für 4 min in 10 %ige Essigsäure und anschließend für 30 min in destilliertes Wasser gelegt. Nach der Trocknung über 24 h bei Raumtemperatur konnte das Gel mit einem Agfa Arcus 1200 Scanner digitalisiert,

gespeichert und anschließend in handelsübliche Frischhaltefolie gewickelt aufbewahrt werden.

2.6.1.10 Auswertung

Die Auswertung der SSCP-Gele erfolgte mittels Gel Compar II (Applied Maths) und Microsoft Excel.

2.6.2 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung vorgesehene DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und mittels „Crush & Soak-Methode“ extrahiert. Hierfür wurden sie jeweils in ein mit 50 µl Crush & Soak-Puffer befülltes Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden die Banden über 3 h bei 37 °C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 40 µl der Lösung abgenommen, mit 80 µl Ethanol versetzt und bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Am nächsten Tag wurden jeder Probe 2 µl Glycogen (20 mg/ml) zugegeben und 15 min bei 2400 g bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 20 µl TE-Puffer gelöst. Mit dieser Lösung erfolgte eine PCR mit Com-Primern im Dreifachansatz mit anschließender Reinigung und Quantifizierung der PCR-Produkte. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma „Seqiserve GmbH“ in Vaterstetten.

Zuletzt wurden die Sequenzen mit der Gendatenbank „ENA European Nucleotide Archive“ (<http://www.ebi.ac.uk/ena/>) bzw. NCBI-Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) abgeglichen.

2.7 Vorgehen zur Auswahl potentieller Inokulumstämme

2.7.1 Kriterien zur Auswahl potentieller Inokulumstämme

Ergebnisse der Analyse des intestinalen Mikrobioms von Tieren aus unterschiedlichen Haltungsformen bildeten die Grundlage zur Auswahl potentieller Inokulumstämme („competitive exclusion“). Der Fokus wurde hierbei auf jene Keime gelegt, welche sich nach den mikrobiologisch-kulturellen Untersuchungen bei keimarm gehaltenen Käfigtieren bzw. Küken aus Maststallhaltung mit verminderter Präsenz zeigten und gleichzeitig aus dem Mikrobiom von Wildhühnern angezüchtet werden konnten. Infolge dessen wurden *Enterococcus faecium* (n = 8) sowie *Enterococcus mundtii* (n = 16) Isolate

aus Kloakentupferproben von finnischen Wildhühnern auf ihre Eignung als Inokulumstämme zur Verabreichung an frisch geschlüpfte Jungtiere evaluiert.

2.7.2 Prüfung der Antibiotikaresistenz

Enterococcus faecium (n = 8) sowie *Enterococcus mundtii* (n = 16) Isolate aus Kloakentupferproben vom Wildhuhn (Finnland) wurden zunächst auf phänotypische Antibiotikaresistenz getestet. Die angewandte Vorgehensweise wird unter Punkt 2.5.1.5 beschrieben, wobei für die *Enterococcus mundtii*-Isolate auf ein adaptiertes Verfahren nach Hölzel (2006) zurückgegriffen wurde, bei der die kation-adjustierte Müller-Hinton-Bouillon (CAMHB) durch Hämophilus-Test-Supplement supplementiert wird. Diese Methode berücksichtigt das mäßig unterstützte Wachstum von *Enterococcus nonfaecalis/nonfaecium*-Stämmen in reiner CAMHB, wodurch es schwierig wird, Wachstum und Trailing dieser Spezies nach der „20 % Regel“ zu unterscheiden (Hölzel, 2006).

2.7.3 Prüfung der Zytotoxizität

Zur Überprüfung von Effekten potentieller Inokulumstämme (n = 24) auf Stoffwechselfparameter von Verozellen wurde der MTT-Assay durchgeführt, der erstmals von Mosmann et al. (1983) für Zellkulturen beschrieben wurde. Dabei wird die Zellviabilität *in vitro* indirekt über die enzymatische Aktivität der Zellen kolorimetrisch erfasst, sodass dieser Test auch zur Überprüfung wachstumsinhibierender oder -stimulierender Wirkung verschiedener Substrate an Zelllinien genutzt werden kann (Mosmann, 1983).

Der Nachweis der Zellvitalität basiert auf der Reduktion des schwach gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), bei der ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan entsteht (Altmann, 1976). Diese Reduktion ist ein Maß für den Redox-Status einer Zellpopulation, läuft nur in lebenden Zellen ab und kann als Lebensfähigkeit oder metabolische Aktivität wiedergegeben werden (Gareis, 2006).

Die Durchführung des MTT-Tests erfolgte im vorliegenden Versuch nach Gareis (2006) und wird im Folgenden beschrieben.

Der MTT-Assay wurde mit adhärenenten Vero-Zellen durchgeführt, welche zuvor in RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 2 % fetalem Kälberserum, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert wurden. Nach Überprüfung des

Zustandes der Zellen am Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung wurde zunächst das gesamte Medium abgenommen und die Zellen im Anschluss mit 5 ml PBS (pH 7,4) gewaschen. Nach Verwerfen der Spüllösung folgte ein weiterer Waschschriff mit 5 ml Saline-Trypsin-Versen. Um als nächstes die adhaerenten Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurden diese erneut mit 5 ml Saline-Trypsin-Versen benetzt und bei 37 °C für 10 min (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt, in welches auch die durch anschließendes spülen der Zellkulturflasche mit 10 ml RPMI-Medium entstandene Waschlösung gegeben wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 135 g für 3 min, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml RPMI-Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen musste nun die Trypanblaufärbung erfolgen. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und daher im lichtmikroskopischen Bild hell erscheinen, durchdringt der Farbstoff die Zellmembran toter Zellen und färbt diese tiefblau.

Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 990 µl Trypanblaulösung gemischt und 3 min in der Hand geschwenkt. 10 µl dieser Mischung wurden in die vorbereitete Fuchs-Rosenthalkammer verbracht und die Anzahl lebender Zellen durch auszählen ermittelt. Für den MTT-Assay wurde eine Zellkonzentration 1 x 10⁶ Zellen/ml angestrebt, diese wurde durch zufügen von RPMI-Medium eingestellt. Das Gesamtvolumen, mit der die gewünschte Zelldichte erreicht wird, kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Gesamtvolumen} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Suspensionsmenge} \times \text{Kammerfaktor}}{\text{gewünschte Zelldichte} \times \text{ausgezählte Kleinstquadrate}}$$

Nun wurden jeweils 100 µl der auf 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellten Suspension in die zentralen Kavitäten (B2-B11 bis G2-G11) der 96-well Mikrotiterplatten eingesät und die äußeren Felder (A1-G1, A2-A11, A12-H11, H1-H12) aufgrund größerer Verdunstung in den Randbereichen mit je 200 µl PBS befüllt.

Um die angestrebte Konfluenz des Zellrasens von 80-100 % zu erreichen folgte ein Inkubationsschritt für 24 h bei 37 °C (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit).

Parallel fand die Toxinanreicherung der Proben statt (nach Hörmansdorfer *et al.*, 1995). Hierzu wurden die Bakterienisolate ($n = 24$) zunächst aufgetaut, subkultiviert und anschließend je 5 Einzelkolonien der Testkeime in 25 ml RPMI-Medium gegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt für 24 h bei 37 °C und 120 rpm auf dem Schüttler. Aus diesen Kulturen wurde je 1 ml entnommen, damit eine dezimale Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung angelegt und die Verdünnungsstufen 10^5 bis 10^9 auf Blutagar ausplattiert. Nach bebrüten bei 37 °C für 24 h konnten die KbE ausgezählt werden. Dieser Schritt diente zum einen zur Reinheitskontrolle, zum anderen der Kontrolle der beim MTT-Assay eingesetzten Bakterienkonzentration, die hier stets im Bereich von 10^8 KbE/ml lag. Die restlichen 24 ml der Bakteriensuspensionen wurden bei 1100 g für 15 min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches 50 ml Falconröhrchen transferiert und sein pH-Wert überprüft; dieser wurde gegebenenfalls mit NaOH (25 %) bzw. HCl (1 mol/l) auf einen neutralen pH-Wert (7,2-7,4) eingestellt. Nachdem sich der pH-Wert bei einer erneuten Messung nach 30 min als stabil erwiesen hatte, wurden die Überstände durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert, um Bakterienreste zu entfernen, und anschließend auf die kultivierten Vero-Zellen gegeben.

Nach der lichtmikroskopischen Kontrolle des Zellrasens bei 40facher Vergrößerung am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch je 100 µl frisches RPMI-164 Medium pro Kavität ersetzt. Nach erneutem entfernen des Mediums aus den Plattenvertiefungen B2-G2 schloss sich der Probenauftrag an, der für jeden Bakterienüberstand auf zwei 96-Loch-Mikrotiterplatten und auf jeder Platte im Dreifachansatz erfolgte. Von den Überständen wurden hierfür je 200 µl mit einer Mehrkanalpipette in die Kavitäten B2-G2 pipettiert und in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 (bis Verdünnungsstufe 1:64) erstellt. Zur Matrixkontrolle bzw. Negativkontrolle diente RPMI-1640 Medium, als Positivkontrolle wurde Gliotoxin (Konzentration 10 µg/ml) eingesetzt. Nachdem leer gebliebene Kavitäten der Mikrotiterplatte mit 100 µl PBS befüllt wurden, erfolgte ein Inkubationsschritt für 24 h bei 37 °C (5% CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit).

Am dritten Tag wurden zunächst in jede Kavität, die Vero-Zellen enthielt, 20 µl MTT zugegeben und die Platten für 1 h bei 37 °C (5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit) bebrütet. Im Anschluss daran wurde die gesamte MTT Lösung,

die bakteriellen Überstände und das RPMI-Medium von den Zellen abgenommen, durch 100 µl des organischen Lösungsmittels DMSO ersetzt und die Platten bei 350 rpm auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 5 min geschüttelt. Dieser Schritt diente dazu, die in den lebenden Zellen entstandenen Formazankristalle in Lösung zu bringen.

Nun wurden die Extinktionen auf einem ELISA-Reader bei 490 nm gemessen. Für die Auswertung des MTT-Tests wurden die unbehandelten Zellkontrollen der entsprechenden Mikrotiterplatten als 100 % Spaltungsaktivität definiert und die Messwerte der Proben dazu in Relation hierzu gesetzt. Die relative MTT-Spaltungsaktivität wurde durch folgende Formel berechnet:

$$MTT - \text{Spaltungsaktivität (\%)} = \frac{OD (Probe) \times 100}{OD (Zellkontrolle)}$$

Um Effekte der Proben auf die Stoffwechselaktivität von Verozellen vergleichbar zu machen, wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, d. h. die Konzentration der Probe, die in Relation zur Kontrolle eine 50 %ige Reduktion der MTT-Spaltungsaktivität bewirkt (Gareis, 2006).

2.7.4 Typisierung mittels RAPD-PCR

Die RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)-PCR wurde erstmals von Williams *et al.*, (1990) beschrieben. Bei dieser Fingerprinting-Methode kommt nur ein Primer, meist ein Dekanukleotid, zum Einsatz, dessen Sequenz willkürlich gewählt wird. Aufgrund der geringen Länge des Primers ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass komplementäre Sequenzen in der zu untersuchenden DNA vorhanden sind. Wenn es nun in ausreichend geringer Entfernung zur Anlagerung zweier Primer in aufeinander zuweisender Richtung kommt, wird dieser DNA-Ausschnitt vervielfältigt. So wird nicht gezielt ein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert, vielmehr entstehen durch die mehrfache Anlagerung der Primer verschiedene zufällige Produkte aus mehreren DNA-Fragmenten, mit artspezifischem Peak- bzw. Bandenmuster (Williams, 1990).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die RAPD-PCR zum Amplicon-typing der potentiellen Inokulumstämme (n = 24) genutzt, um diese Isolate näher zu typisieren, Klonalität auszuschließen und ihre Nachverfolgung zu erleichtern.

Acht *Enterococcus faecium* sowie 16 *Enterococcus mundtii*-Isolate aus Kloakentupferproben vom Wildvogel wurden mittels RAPD-PCR typisiert.

Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der Reagenzien für den PCR-Einzelansatz. Der hierbei verwendete Primer D8635:GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC wurde bereits in früheren Studien zur näheren Charakterisierung von *Enterococcus faecium*-Isolaten mittels RAPD-PCR eingesetzt (Schwaiger *et al.*, 2014). Dort wie in der vorliegenden Studie erfolgte die PCR für jedes Isolat in zwei Ansätzen mit unterschiedlichen Thermocycler-Protokollen (nach Andrichetto *et al.*, 2001), dargestellt in Tabelle 9. Pro PCR-Ansatz wurden jeweils 24 µl Mastermix und 1 µl Template eingesetzt, Anschließend wurden die entstandenen Amplifikate durch horizontale Gelelektrophorese in 1 %igem Agarosegel überprüft und deren Bandenmuster miteinander verglichen.

Tabelle 8: Reagenzien für den PCR-Ansatz der RAPD-PCR

Reagenzien	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	17,175
10x Puffer inkl. 15 mM MgCl ₂	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	1,5
dNTPs [je 10 mM]	0,625
Primer D8635 [10 µM]	2
HotStar Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,2
DNA-Template	1
Gesamtvolumen	25

Tabelle 9: Thermocyclerprogramm für die RAPD-PCR (Protokoll 1)

PCR-Ablauf	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Einleitende Denaturierung	95	900	
Denaturierung	94	60	} 35 Zyklen
Annealing	47	60	
Elongation	72	90	
Terminale Elongation	72	600	

Tabelle 10: Thermocyclerprogramm für die RAPD-PCR (Protokoll 2)

PCR-Ablauf	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
	95	900	
Pre-PCR Cycle	40	300	
	72	300	
Denaturierung	94	60	} 35 Zyklen
Annealing	52	60	
Elongation	72	120	
Terminale Elongation	72	600	

2.7.5 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität gegen Pathogene

Um die antimikrobielle Aktivität potentieller Inokulumstämme gegenüber Pathogenen zu untersuchen, wurde der Agar-Diffusionstest nach Schillinger und Lucke (1989) durchgeführt; modifiziert nach Maldonado *et al.* (2012) und interpretiert nach Nader-Macias *et al.* (2008).

Zunächst wurden Überstände aus Bakterienzellsuspensionen der Testkeime (n = 24) hergestellt. Hierzu wurden *Enterococcus faecium* (n = 8) und *Enterococcus mundtii* (n = 16) Isolate auf Blutagarplatten ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 Einzelkolonien der potentiellen Inokulumstämme vom Agar abgenommen, in 10 ml LB-Medium eingerührt und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (120 rpm) erneut bebrütet. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2320 g für 15 min, anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert.

Parallel erfolgte die Vorbereitung der zu hemmenden Mikroorganismen. Ausgewählt wurden hierfür *Bacillus subtilis* (Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. 84), *Clostridium perfringens* (Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. 12), *E. coli* DSM 1103, *E. coli* O:101 K:99 (Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. 33), *Ent. faecalis* DSM 2570, *Ent. faecium* DSM 20477, *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 und *Salmonella* Typhimurium DSM 554. Von Übernachtskulturen dieser Bakterien wurden zunächst so viele Einzelkolonien in physiologische NaCl-Lösung überführt, bis diese einen McFarland Trübungsstandard von 2 (*Clostridium perfringens*. und *Enterococcus* spp.) bzw. 0,5 (*Bacillus* spp., *E. coli* und *Salmonella* sp.) aufwies. Anschließend wurde ein steriler Wattetupfer mit der Suspension getränkt und diese sehr dicht auf Nährbodenplatten ausgestrichen. Hierfür wurden als Nährmedien Blutagar (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus* spp.,

Salmonella Typhimurium), Normalagar (*Geobacillus stearothermophilus*, *E. coli*) und Schaedler-Agar (*Clostridium* sp., anaerob bebrütet) verwendet. Nun wurden aus jeder Agarplatte mit Hilfe eines handelsüblichen Korkbohrers 4 Löcher mit einem Durchmesser von jeweils 5 cm ausgestanzt. Zwei dieser Löcher wurden mit je 35 µl bakteriellem Überstand befüllt, in das 3. Stanzloch kamen 35 µl LB-Medium (Negativkontrolle). Jeder Probenansatz erfolgte im Doppelansatz. Als Positivkontrolle wurde außerdem Tetrazyklin (10 µg/ml) eingesetzt. Hier wurden die zu hemmenden Mikroorganismen auf die oben beschriebene Weise auf die entsprechenden Nährmedien aufgebracht, je ein Loch in die Agarplatten gestanzt und dieses mit 35 µl Antibiotikallösung befüllt.

Um zunächst die Diffusion der Testsubstanzen in den Agar zu ermöglichen, wurden die beimpften Nährböden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ihre Bebrütung bei 37 °C, bzw. bei 60 °C für *Geobacillus stearothermophilus*, für 24 h. Die Auswertung erfolgte durch Messung des Hemmhofs.

2.7.6 Untersuchung auf Keimkonkurrenz-Eigenschaften

2.7.6.1 Keimkonkurrenz-Versuch 1

Isolate, die beim Test auf antimikrobielle Aktivität einen hemmenden Effekt zeigten, wurden anschließend in einem weiteren Versuch auf Keimkonkurrenz-Eigenschaften untersucht, um ihre inhibitorischen Effekte als Mono-Spezies auf das Wachstum problematischer Keime *in vitro* weiter zu erfassen.

Hierbei wurde die Kompetitionsfähigkeit der potentiellen Inokulumstämme (n = 2) gegenüber Antibiotika-resistenten bzw. pathogenen Indexbakterien nach der Methode von Nichols *et al.* (1992) (mit Modifikationen) überprüft.

Als „zu hemmende“ Mikroorganismen, welche ebenfalls aus Proben von Hühnern stammten, dienten zum einen ein *E. coli*-Isolat (Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. I-K-2-Eco1) zum anderen *Salmonella* sp. (Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. II-A3-S-05a), beide mit bekannter Antibiotikaresistenz.

Zunächst wurden die im Versuch eingesetzten Bakterien einzeln auf Blutagarplatten ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nun wurden von jedem Nährmedium Einzelkolonien (n = 5) in je 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht bebrütet (37 °C, 120 rpm). Aus den Flüssigkulturen erfolgte am

nächsten Tag das Anlegen von Verdünnungsreihen in physiologischer Kochsalzlösung mit dem Faktor 10, um auf diese Weise Suspensionen mit unterschiedlichen Bakterienzellanteilen zu erhalten. Diese Konzentrationen wurden durch Ausplattieren der Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-11} auf Blutagar, anschließendes Bebrüten (37 °C, 24 h) und Auszählen der KbE überprüft.

In je 100 ml LB-Medium wurden nun verschiedene Anteile der jeweiligen Testkeime sowie eines *E. coli*- bzw. *Salmonella*- spp. Stammes pipettiert und bei 37 °C auf dem Schüttler (120 rpm) bebrütet. Testkeim und zu hemmender Keim wurden in Konzentrationsverhältnissen von $10^6:10^6$; $10^2:10^2$; $10^6:10^2$ und $10^2:10^6$ eingesetzt. Zudem wurden die zu hemmenden Keime als Referenzwerte jeweils in Reinkultur angezüchtet.

Nach 0 – 5 h Bebrütungszeit (stündlich) sowie nach 24 h, 48 h und 72 h bebrüten wurden aus diesen Bakteriengemischen Verdünnungsreihen mit dem Faktor 10 erstellt, auf Blutagarplatten ausgespatelt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Auszählen von jeweils mindestens zwei Nährböden aufeinanderfolgender Verdünnungsstufen, wobei Testkeime von Enterobacteriaceae aufgrund ihrer Morphologie unterschieden wurden. Nach Multiplikation mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor wurde der gewichtete Mittelwert ausgezählter Platten als durchschnittlicher Keimgehalt berechnet. Aus den erhaltenen Werten konnten nun Wachstumskurven erstellt werden, um die Kompetitionsfähigkeit der potentiellen Inokulumstämme darzustellen. Von den im Versuch eingesetzten Bakterien wurden außerdem individuelle Wachstumskurven angefertigt, um ihr Wachstumsverhalten im Flüssigmedium ohne Konkurrenzsituation zu erfassen. Der Versuch wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

2.7.6.2 Keimkonkurrenz-Versuch 2

In einem weiteren Versuch wurde die Kompetitionsfähigkeit eines potentiellen Inokulum-Stammes gegenüber *E. coli*-Isolaten (n = 43) untersucht. Hierbei eingesetzte *E. coli* waren zuvor aus Zäkumproben von Eintagsküken aus Maststallhaltung isoliert und auf ihre phänotypische Antibiotikaresistenz getestet worden (siehe Punkt 2.5.1.5). Die Vorgehensweise zum Keimkonkurrenz-Versuch ist im Folgenden geschildert.

Sämtliche Keime wurden zunächst auf Blutagar ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Im Anschluss wurden von jedem Isolat Einzelkolonien ($n = 5$) in je 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht auf dem Schüttler bebrütet (37 °C, 120 rpm). Aus Bakterienzellsuspensionen der *E. coli*-Isolate wurde nun je 1 ml entnommen, mit 9 ml LB-Medium diluiert und aus dieser Verdünnung wiederum 100 µl in je 10 ml LB-Medium überführt. In jede dieser Flüssigkulturen wurden zudem 100 µl aus der Übernachtskultur des Testkeimes pipettiert, so dass „zu hemmende“ *E. coli* und auf Keimkonkurrenzeigenschaften evaluierter Testkeim letztendlich im Konzentrationsverhältnis $10^6:10^6$ KbE/ml im LB-Medium vorlagen. Außerdem wurden sämtliche Isolate in Reinkultur mit einer Ausgangskonzentration von 10^6 KbE/ml Medium angezüchtet. Um die vorherrschenden Keimkonzentrationen zu überprüfen, wurde aus jeder angelegten Flüssigkultur eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 erstellt, die Verdünnungsstufen 10^4 - 10^7 auf Blutagar ausplattiert, bebrütet (24 h, 37 °C) und die KbE ausgezählt, wobei die Unterscheidung von Testkeim und *E. coli* anhand ihrer Koloniemorphologie erfolgte. Nun schloss sich ein dreitägiger Inkubationsschritt (37 °C, 120 rpm) an. Nach 72 h wurden erneut Verdünnungsreihen (Faktor 10) aus den Kulturen erstellt und die Verdünnungsstufen 10^5 - 10^8 auf Blutagar ausgespatelt. Auf die Bebrütung der beimpften Nährböden (37 °C, 24 h) folgte wiederum das Auszählen der KbE. Nach Multiplikation mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor konnte nun der Mittelwert ausgezählter Platten als durchschnittlicher Keimgehalt berechnet und in KbE/ml Medium angegeben werden.

IV ERGEBNISSE

1 Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Tieren aus unterschiedlichen Haltungsförmn

1.1 Keimzahlen

Von den gewonnenen Proben des zäkalen Darminhalts und der Blinddarmmukosa der drei untersuchten Tiergruppen – physiologisch inokulierte Volierentiere, keimarm gehaltene Käfigtiere sowie konventionell aufgezogene Tiere aus Maststallhaltung – wurden die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, die anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl, sowie die Zahl der auf entsprechenden Selektivnährböden wachsenden *Enterococcus* spp., der Enterobacteriaceae und der *Lactobacillus* spp. bestimmt. Die Keimzahlen des Mikrobioms im Darminhalt sind in KbE pro cm³ Darmvolumen angegeben, die der Mukosa-assoziierten Mikroorganismen in KbE pro cm² Darmgrundfläche.

1.1.1 Tiere aus Volieren- und Käfighaltung

1.1.1.1 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Die Entwicklung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen in Darminhalt und assoziiert zur Mukosa von Tieren aus Volieren- und Käfighaltung zeigen Abbildung 8 und Abbildung 9.

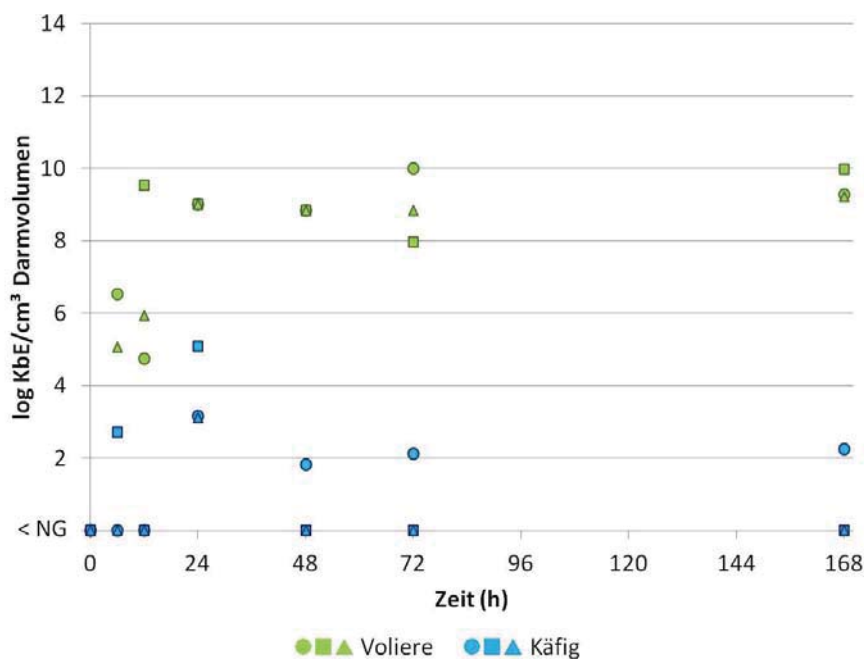


Abbildung 8: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

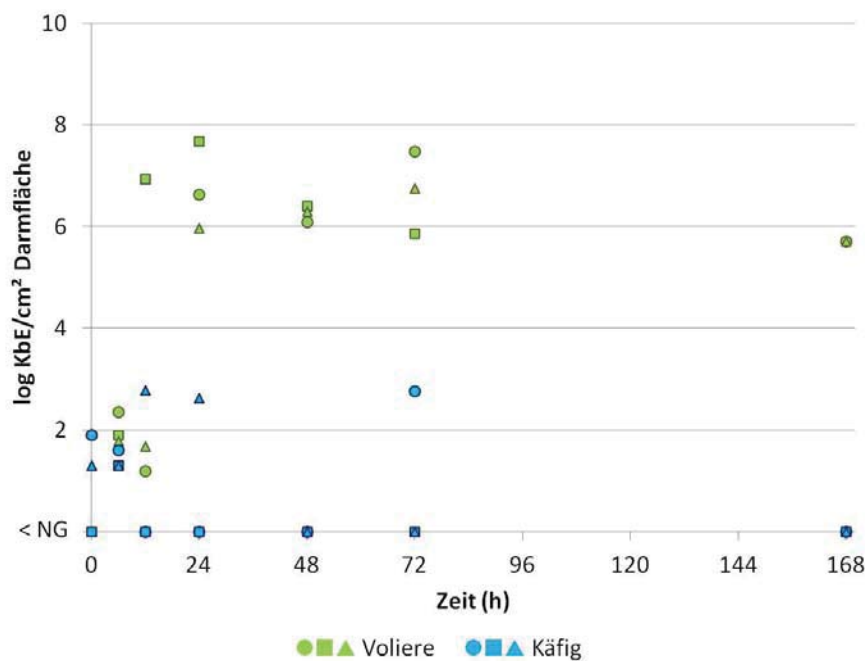


Abbildung 9: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

Legende: Zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48, 72 h sowie nach 7 Tagen wurden je drei Tiere zur Probennahme getötet. Die unterschiedlichen Symbole dienen zur Unterscheidung der je Zeitpunkt beprobten Tiere.

Es zeigte sich deutlich, dass die mesophilen aeroben Keimzahlen bei keimarm gehaltenen Tieren aus Käfighaltung erheblich geringer ausfielen als bei physiologisch inokulierten Tieren in Volierenhaltung. Dies konnte sowohl für Mikroorganismen im Darminhalt als auch für das Mukosa-assoziierte Mikrobiom beobachtet werden. Bis zu einem Alter von 12 Lebensstunden war bei den Volierentieren ein starker Anstieg an aeroben mesophilen Keimzahlen zu verzeichnen, nach 24 h lagen die Werte für den Darminhalt bei $1,0 \times 10^9$ pro cm^3 Darmvolumen, für die Mukosa wurden zu diesem Zeitpunkt Konzentrationen von $9,3 \times 10^5$ bis $4,9 \times 10^7$ pro cm^2 Darmgrundfläche ermittelt.

1.1.1.2 Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Die Entwicklung der anaeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen in Darminhalt und assoziiert zur Mukosa von Tieren aus Volieren- und Käfighaltung zeigen Abbildung 10 und Abbildung 11.

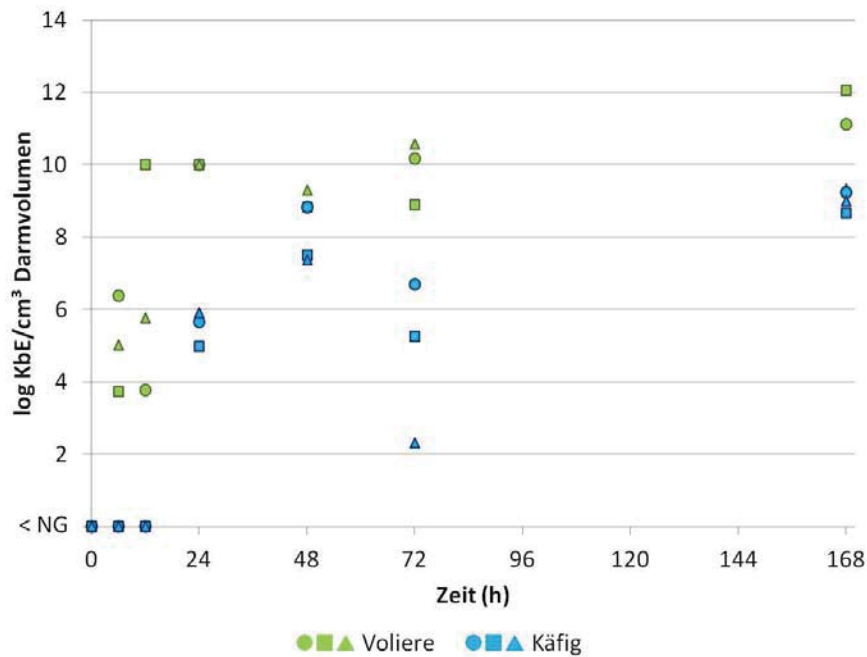


Abbildung 10: Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

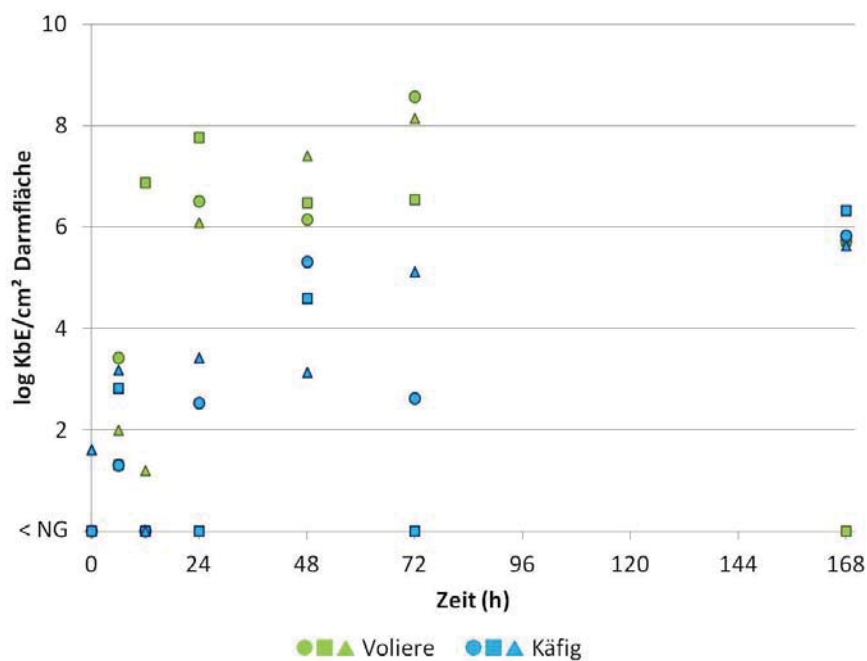


Abbildung 11: Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

Die anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl stieg bei physiologisch inokulierten Tieren aus Volierenhaltung bis zur Probennahme 24 h nach dem Schlupf stark an, auf Werte von $1,0 \times 10^{10}$ KbE pro cm^3 Darmvolumen bzw. $1,2 \times 10^6$ bis $5,8 \times 10^7$

KbE pro cm² Darmgrundfläche. Während die Werte der Küken aus Volierenhaltung am Ende der ersten Lebenswoche im Darminhalt Werte von $2,2 \times 10^9$ bis $1,1 \times 10^{12}$ KbE pro cm³ erreichten, fiel der Anteil der Mukosa-assoziierten Anaerobier auf Werte $\leq 10^6$ pro cm². Die Werte keimarm gehaltener Tiere schwankten erheblich, erreichten aber am Ende der ersten Lebenswoche beträchtliche Konzentrationen: $\geq 10^8$ KbE pro cm³ (Darminhalt) bzw. $4,2 \times 10^5$ bis $2,1 \times 10^6$ KbE pro cm² (Mukosa).

1.1.1.3 Enterobacteriaceae

Die Entwicklung der Enterobacteriaceae-Keimzahlen in Darminhalt und assoziiert zur Mukosa von Tieren aus Volieren- und Käfighaltung zeigen Abbildung 12 und Abbildung 13.

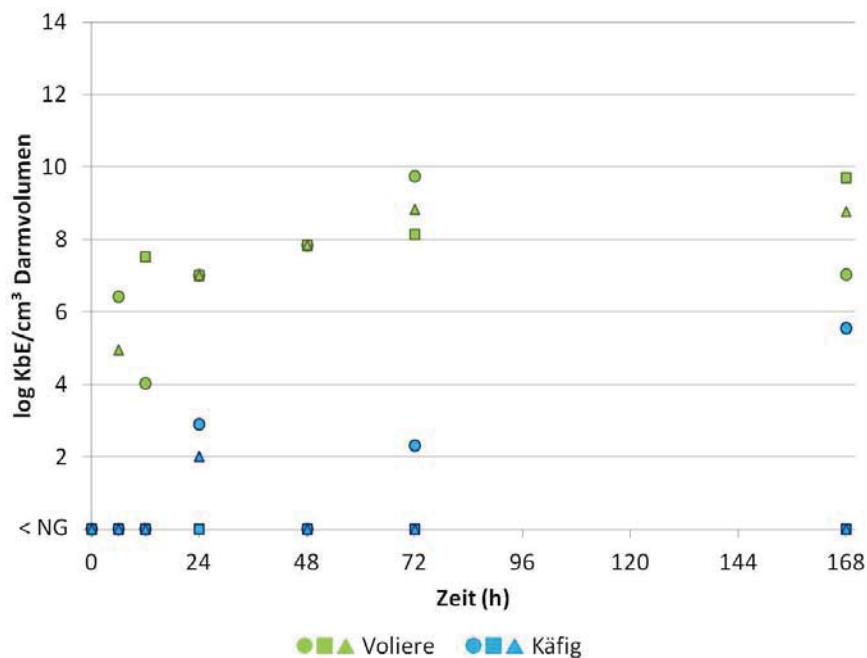


Abbildung 12: Enterobacteriaceae-Konzentration im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

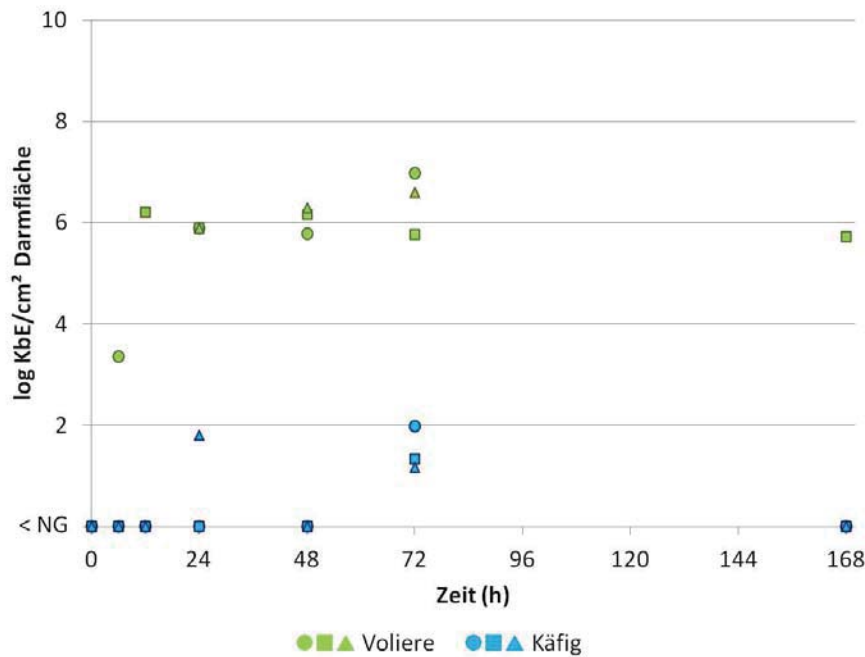


Abbildung 13: Enterobacteriaceae-Konzentration assoziiert zur zökalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

Während die Zahl der Enterobacteriaceae im Darminhalt von keimarm gehaltenen Käfigtieren innerhalb der ersten 72 h relativ niedrig blieb ($\leq 10^2$ KbE pro cm^3 Darmvolumen), stieg sie bei physiologisch inokulierten Tieren in Volierenhaltung anfangs stark an und erreichte nach 72 h Werte von $1,4 \times 10^8$ bis $5,5 \times 10^9$ pro cm^3 . Die Konzentration der Mukosa-assoziierten Enterobacteriaceae lag bei physiologisch inokulierten Tieren nach 72 h bei Werten von $5,7 \times 10^5$ bis $9,3 \times 10^6$ pro cm^2 Darmgrundfläche. Am Ende der ersten Lebenswoche wurde bei einem Volierentier ein Wert von $5,3 \times 10^5$ KbE pro cm^2 ermittelt; für zwei Küken dieser Tiergruppe lag die Konzentration Mukosa-assoziiierter Enterobacteriaceae nun unter der Nachweisgrenze der angewandten Methode.

1.1.1.4 *Lactobacillus* spp.

Die Entwicklung der *Lactobacillus* spp.-Keimzahlen in Darminhalt und assoziiert zur Mukosa von Tieren aus Volieren- und Käfighaltung zeigen die Abbildung 14 und Abbildung 15.

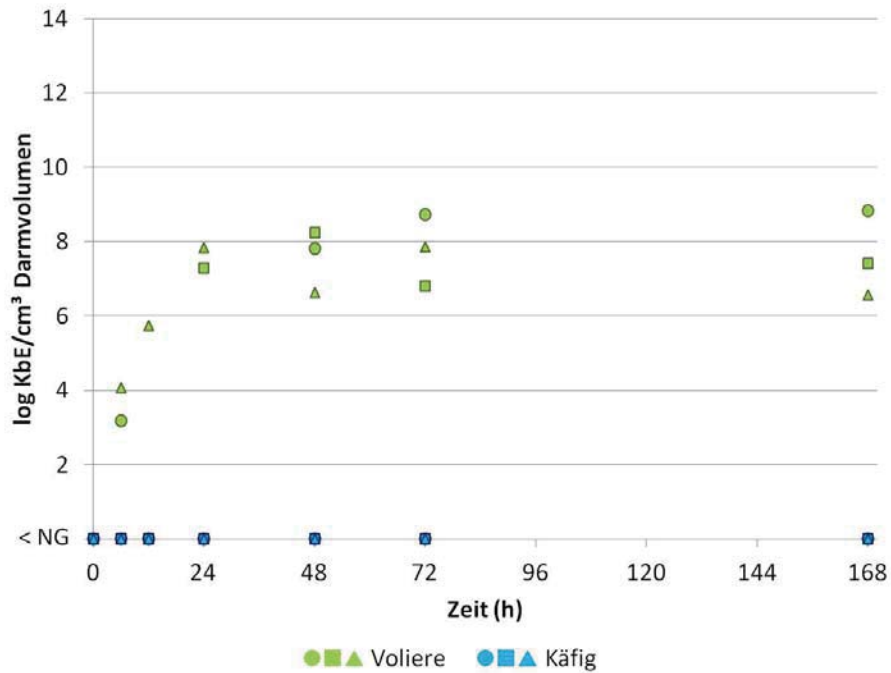


Abbildung 14: *Lactobacillus* spp.-Keimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

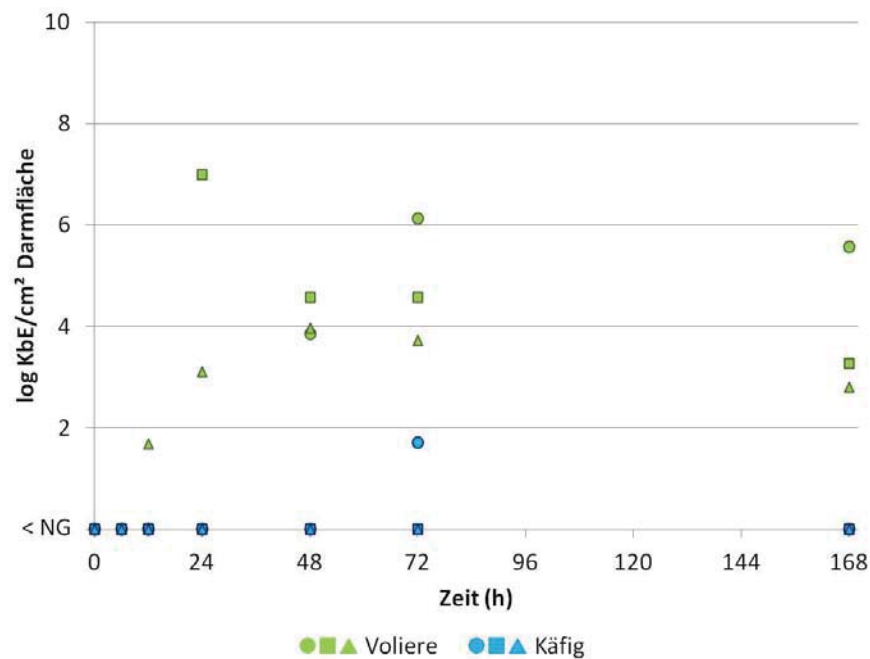


Abbildung 15: *Lactobacillus* spp.-Keimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

Laktobazillen blieben in den Proben der keimarm gehaltenen Käfigtiere nahezu durchgehend unter der Nachweisgrenze, während ihre Zahl pro cm³ Darmvolumen bei den physiologisch inokulierten Küken in Volierenhaltung stark

anstieg und nach 48 h Konzentrationen von $4,2 \times 10^6$ bis $1,7 \times 10^8$ KbE pro cm^3 erreichte. Assoziiert zur zäkalen Mukosa unterlag die Anzahl an Laktobazillen bei den Volierentieren gewissen Schwankungen und erreichte 48 h nach dem Schlupf Werte von $7,2 \times 10^3$ bis $3,6 \times 10^4$ pro cm^2 Darmgrundfläche, zum Zeitpunkt 7 Tage wurden Konzentrationen von $6,4 \times 10^2$ bis $3,7 \times 10^5$ pro cm^2 ermittelt.

1.1.1.5 *Enterococcus* spp.

Die Entwicklung der *Enterococcus* spp.-Keimzahlen in Darminhalt und Mukosa von Tieren aus Volieren- und Käfighaltung zeigen Abbildung 16 und Abbildung 17.

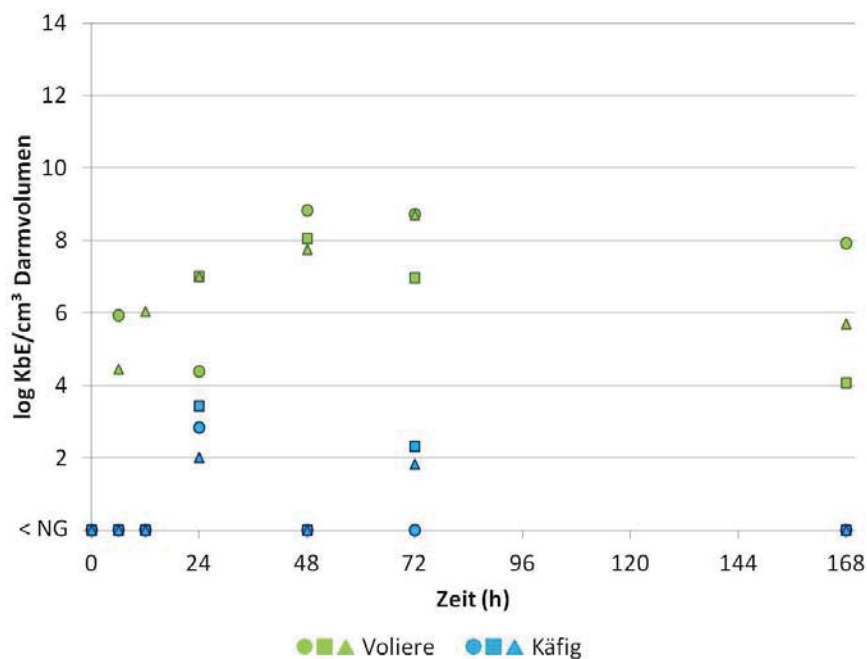


Abbildung 16: *Enterococcus* spp.-Keimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

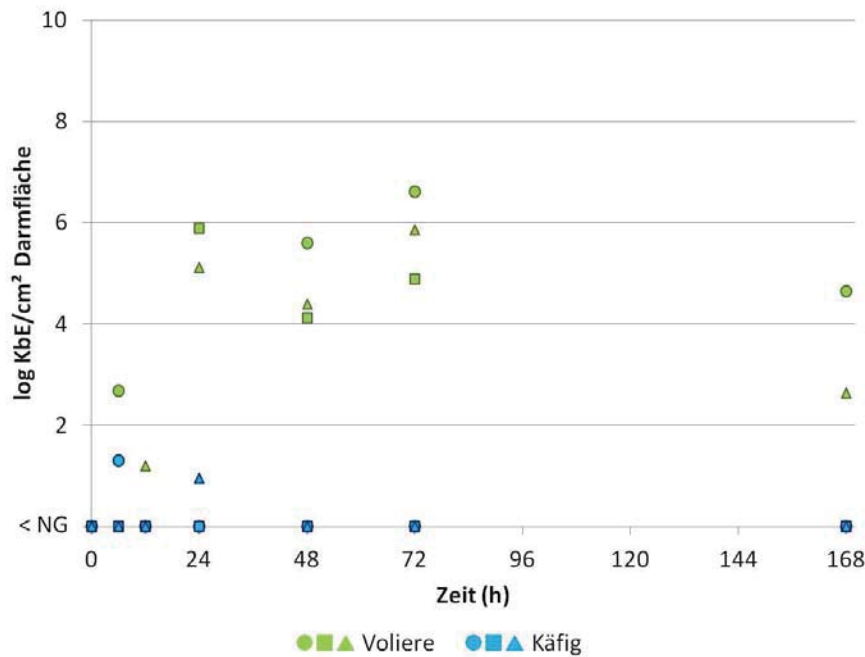


Abbildung 17: *Enterococcus* spp.-Keimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)

Auch *Enterococcus* spp. waren bei keimarm gehaltenen Tieren nur sporadisch und wenn dann in geringer Konzentration ($\leq 10^3$ KbE pro cm^3 Darmvolumen bzw. $\leq 10^1$ KbE pro cm^2 Darmfläche) nachweisbar. Bei physiologisch inokulierten Volierentieren wurden im Darminhalt nach 72 h Werte von $9,4 \times 10^6$ bis $5,3 \times 10^8$ KbE pro cm^3 Darm erreicht, für Mukosa-assoziierte *Enterococcus* spp. wurden zu diesem Zeitpunkt Konzentrationen von $7,5 \times 10^4$ bis $4,0 \times 10^6$ KbE pro cm^2 Darmfläche ermittelt.

1.1.2 Tiere aus Maststallhaltung

1.1.2.1 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Wie schon bei Küken aus Volierenhaltung beobachtet stieg auch bei konventionell gehaltenen Masttieren (n = 6) die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl im Darminhalt innerhalb der ersten 24 h steil an. Nach einer weiteren dezenten Erhöhung wurden nach 48 h Werte von $1,6 \times 10^9$ bis $1,2 \times 10^{10}$ KbE pro cm^3 Darm erreicht. Zu späteren Beprobungszeitpunkten zeigten sich die ermittelten Keimzahlen relativ stabil: sie lagen von Tag 21 bis Tag 35 bei $1,6 \times 10^6$ bis $6,8 \times 10^8$ KbE pro cm^3 Darminhalt.

Für die Mukosa-assoziierten mesophilen Keime verlief der Anstieg ebenfalls steil, Maximalwerte wurden teilweise schon nach 24 h erreicht. Von Tag 7 bis 35 waren starke individuelle Schwankungen zu beobachten, die Konzentrationen lagen nun bei Werten von $3,5 \times 10^4$ bis $1,2 \times 10^7$ KbE pro cm^2 Darmgrundfläche.

1.1.2.2 Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Auch für die anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl im Darminhalt der Küken ($n = 6$) war 24 h nach dem Schlupf ein sehr deutlicher initialer Anstieg – auf Keimkonzentrationen von $1,5 \times 10^9$ bis $2,7 \times 10^9$ pro cm^3 Darm – zu beobachten, an den sich ein Plateau anschloss. Hierbei wurden von Tag 21 bis Tag 35 Werte von $2,3 \times 10^7$ bis $2,3 \times 10^9$ pro cm^3 Darm ermittelt.

Für das Mukosa-assoziierte Mikrobiom lagen die Keimzahlen an Tag 7 bei Werten von $1,0 \times 10^6$ bis $5,1 \times 10^7$ KbE pro cm^2 Darmfläche. Die Konzentration der anaeroben mesophilen Mikroorganismen zeigte sich im folgenden Untersuchungszeitraum relativ stabil und erreichte von Tag 21 bis zum Ende des Beprobungszeitraums (35 Tage) – wiederum mit individuellen Schwankungen $1,4 \times 10^5$ bis $1,6 \times 10^8$ KbE pro cm^2 Darmgrundfläche.

1.1.2.3 Enterobacteriaceae

An Tag 1 und 2 nach dem Schlupf konnten für den Darminhalt der Küken aus Maststallhaltung (je $n = 6$ pro Zeitpunkt) Enterobacteriaceae-Gehalte von $1,5 \times 10^8$ bis $3,1 \times 10^9$ nachgewiesen werden. Mit Werten von $1,6 \times 10^6$ bis $1,1 \times 10^9$ waren Enterobacteriaceae im folgenden Untersuchungszeitraum (Tag 7 – 35) stabil im intestinalen Mikrobiom der Tiere vertreten.

Mukosa-assoziierte Enterobacteriaceae erreichten bei konventionell gehaltenen Masttieren bereits nach 24 h Konzentrationen von $1,2 \times 10^6$ bis $2,0 \times 10^7$ KbE pro cm^2 . Im Anschluss (7. – 35. Tag der Probennahme) lagen die Enterobacteriaceae-Konzentrationen für die Mukosa bei $4,8 \times 10^4$ bis $1,4 \times 10^7$ KbE pro cm^2 .

1.1.2.4 *Lactobacillus* spp.

Sowohl im Darminhalt als auch Mukosa-assoziiert konnten Laktobazillen bei Küken aus Maststallhaltung ($n = 6$) erst ab dem Zeitpunkt 48 h nachgewiesen werden. Für das Mikrobiom im Darminhalt wurden nach einer Woche stabile *Lactobacillus* spp.-Konzentrationen erreicht, sie lagen an Tag 7 zwischen $4,1 \times 10^6$ und $5,4 \times 10^7$ KbE pro cm^3 Darm. An den Tagen 21 und 35 der

Probennahme konnten schließlich Werte von $4,7 \times 10^6$ bis $2,8 \times 10^8$ KbE pro cm^3 Darm nachgewiesen werden.

Mukosa-assoziierte Laktobazillen waren bei Tieren aus Maststallhaltung an Tag 7 in Größenordnungen von $2,1 \times 10^4$ bis $1,2 \times 10^5$ KbE pro cm^2 Darmgrundfläche zu beobachten. Zum nachfolgenden Probennahmezeitpunkt (Tag 21) lagen die *Lactobacillus* spp.-Konzentrationen bei Werten von $1,3 \times 10^4$ bis $1,9 \times 10^6$. An Tag 35 nach dem Schlupf war für Mukosa-assoziierten Keime eine deutliche Streuung der ermittelten Werte zu verzeichnen: sie lagen bei $6,7 \times 10^1$ bis $2,0 \times 10^6$ KbE pro cm^2 .

1.1.2.5 *Enterococcus* spp.

Die Enterokokken-Gehalte im Darminhalt von unter konventionellen Mastbedingungen aufgezogenen Küken ($n = 6$) zeigten kein echtes Plateau, sondern nach einem initialen Anstieg bis 48 h auf Werte von $7,3 \times 10^8$ bis $1,8 \times 10^9$ ein kontinuierliches Absinken. Nach einer Woche wurden im Darminhalt *Enterococcus* spp.-Konzentrationen von $3,6 \times 10^6$ bis $3,2 \times 10^8$ KbE pro cm^3 Darm nachgewiesen.

Ähnliches war für das Mukosa-assoziierte Mikrobiom zu beobachten: während 48 h nach dem Schlupf *Enterococcus* spp.-Keimzahlen von $1,0 \times 10^5$ bis $5,1 \times 10^6$ KbE pro cm^2 Darm ermittelt worden waren, erreichte die Enterokokken-Konzentration bei Tieren aus Maststallhaltung nach 21 Tagen Werte von $2,8 \times 10^3$ bis $3,5 \times 10^5$ KbE pro cm^2 Darm.

1.1.3 Keimzahlen in Proben aus der Umwelt der Tiere

1.1.3.1 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Volieren- und Käfighaltung Bruteier

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung von Spüllösungen der Eischalen kann Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Für Bruteier (Volieren- und Käfighaltung) auf entsprechenden Nährmedien ermittelte Keimzahlen (KbE/g Eischale)

Probe	Mesophile Aerobier	Mesophile Anaerobier	Enterobacteriaceae	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
Ei 1	$2,2 \times 10^5$	$6,5 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	-	-
Ei 2	$2,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	-	-	$2,7 \times 10^3$
Ei 3	$6,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	-	-	-
Ei 4	$9,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	-	-	-
Ei 5	$1,0 \times 10^2$	-	-	-	-
Ei 6	-	-	-	-	-

Bei der Untersuchung der 6 Bruteier, die zum selben Zeitpunkt aus derselben Brüterei bezogen wurden wie die Eier aus denen später die Volierentiere sowie die Küken aus Käfighaltung schlüpften, konnten aus dem Eiinhalt lediglich bei einem Ei Keime angezüchtet werden. Die Konzentration betrug hier 2×10^1 aerobe mesophile Keime pro g Eiinhalt. Anaerobe mesophile Keime, Enterobacteriaceae, *Lactobacillus* spp. sowie *Enterococcus* spp. fielen unter die Nachweisgrenze der angewandten Methode.

Einstreu mit Dung von Althennen

Aus den 3 Proben der Einstreu mit Dung von Althennen, welche den Volierentieren zur Verfügung stand, konnten für jede der auf entsprechenden Nährböden untersuchten Keimgruppen Mikroorganismen angezüchtet werden. Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Für Einstreu mit Dung von Althennen (Volierenhaltung) auf entsprechenden Nährmedien ermittelte Keimzahlen (KbE/g Einstreu)

Probe	Mesophile Aerobier	Mesophile Anaerobier	Enterobacteriaceae	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
Einstreu 1	$9,7 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
Einstreu 2	$1,7 \times 10^9$	$8,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
Einstreu 3	$3,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$5,1 \times 10^5$	$6,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^5$

1.1.3.2 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Maststallhaltung

Eischalen

Aus den Spüllösungen der Eischalen, welche dem Schlupfbrüter entnommen wurden in dem die beprobten Tiere schlüpften, waren keine Keime anzüchtbar.

Futterproben und Trinkwasser

Die ermittelten Keimzahlen von Futterproben und Trinkwasser sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Für Futterproben und Trinkwasser (Maststallhaltung) auf entsprechenden Nährmedien ermittelte Keimzahlen (KbE/g bzw. KbE/ml)

Probe	Mesophile Aerobier	Mesophile Anaerobier	Enterobacteriaceae	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
Kükenstarter	$1,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	-	-
Aufzucht 1	$2,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	-	$2,5 \times 10^3$
Aufzucht 2	$4,6 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$
Finisher	$1,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$	-	$1,4 \times 10^3$
Trinkwasser	$1,3 \times 10^3$	$6,6 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	-	-

Transportkisten

Aus Tupferproben von Transportkisten, in welchen die Küken aus Maststallhaltung von der Brüterei zur Farm transportiert wurden, konnten keine Bakterien angezüchtet werden.

1.2 Qualitative Zusammensetzung

1.2.1 Tiere aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung

Von physiologisch inokulierten Küken aus Volierenhaltung, keimarm gehaltenen Küken aus Käfighaltung sowie konventionell aufgezogenen Tieren aus Maststallhaltung wurde jeweils eine Probe bestehend aus Blinddarminhalt und eine Probe repräsentativ für die zäkale Mukosa kulturell-bakteriologisch untersucht. Zum Zeitpunkt der Tötung und Probennahme waren die Küken aus Volieren- ($n = 21$) und Käfighaltung ($n = 21$) 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 7 Tage alt. Bis zum Probennahmezeitpunkt 7 Tage wurden Küken aus Maststallhaltung ($n = 24$) 0 h, 24 h, 48 h und 7 Tage nach dem Schlupf getötet und beprobt. Dabei konnten sowohl bei den Volierentieren als auch bei den Küken aus Maststallhaltung innerhalb der ersten Woche nach dem Schlupf deutlich mehr unterschiedliche Keimgruppen isoliert und identifiziert werden als bei den Küken aus Käfighaltung (Tabelle 14).

Tabelle 14: Mittels MALDI-TOF-MS identifizierte Darmmikrobiota bei Hühnern (≤ 7 Tage) in unterschiedlichen Haltungsbedingungen

Keimgruppen	Volierenhaltung		Käfighaltung		Maststallhaltung	
	Darminhalt	Mukosa	Darminhalt	Mukosa	Darminhalt	Mukosa
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus flexus</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Bacteroides ovatus</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Bacteroides uniformis</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Citrobacter farmeri</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Citrobacter</i> spp.	-	+	-	-	+	+
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Clostridium</i> spp.	-	+	-	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Enterococcus avium</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus durans</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus gallinarum</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Enterococcus hirae</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella</i> spp.	-	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus ingluvei</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus salivarius</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-	-	-	-	+	+
obligate Anaerobier ^x	-	+	-	+	+	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	-	+	+

x: keine nähere Identifikation mittels MALDI-TOF-MS möglich

Escherichia coli, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus casseliflavus* waren bei allen drei Tiergruppen sowohl im Darminhalt als auch in der Mukosa vertreten. *Enterococcus gallinarum* sowie *Enterococcus avium* konnten bei physiologisch inokulierten und konventionell gehaltenen Küken in Kot und Mukosa gefunden werden, *Enterococcus hirae* war hingegen nur in Proben der konventionell gehaltenen Tiere – hier sowohl in Darminhalt als auch

in Mukosa - nachweisbar. *Enterobacter cloacae* wurde lediglich bei einem Tier aus konventioneller Haltung aus Darminhalt isoliert. *Citrobacter* spp. und *Klebsiella* spp. wurden vereinzelt assoziiert zur Mukosa der Hühner aus Maststallhaltung und der physiologisch inokulierten Volierentiere detektiert, bei konventionell gehaltenen Masttieren waren diese Keime außerdem auch im Darminhalt nachzuweisen.

Proteus mirabilis wurde sowohl bei konventionell gehaltenen als auch bei physiologisch inokulierten Jungtieren gefunden, bei letzteren allerdings lediglich in Darminhaltsproben von 3 Küken. Bei den konventionell aufgezogenen Hühnern hingegen war dieser Keim auch Mukosa-assoziiert nachweisbar. *Proteus mirabilis* konnte innerhalb dieser Tiergruppe zu den Zeitpunkten 48 h und 7 Tage bei 10 von 12 beprobten Küken im Kot und bei 9 von 12 beprobten Küken von der Mukosa isoliert werden.

Wie Tabelle 15 zeigt konnten *Lactobacillus* spp. bei den Küken aus Volierenhaltung bereits innerhalb der ersten 24 h detektiert werden; ab einem Alter von 48 h war diese Keimgruppe bei allen beprobten physiologisch inokulierten Volierentieren stabil nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt (48 h) traten Laktobazillen in den Proben der konventionell gehaltenen Masthühner erstmals in Erscheinung. Während des gesamten Untersuchungszeitraums gab es nur einen positiven Laktobazillen-Nachweis (*Lactobacillus reuteri*) bei den keimarm gehaltenen Käfigtieren. Somit konnte *Lactobacillus reuteri* bei allen beprobten Tiergruppen nachgewiesen werden. *Lactobacillus salivarius* trat bei Küken aus Maststall- und Volierenhaltung in Erscheinung. Ausschließlich bei physiologisch inokulierten Volierentieren wurden *Lactobacillus ingluvei* sowie *Lactobacillus johnsonii* nachgewiesen, während *Lactobacillus vaginalis* sowie *Pediococcus acidilactici* nur bei konventionell gehaltenen Masthühnern isoliert werden konnte.

Tabelle 15: Nachweis von *Lactobacillus* spp. bei Tieren in unterschiedlichen Haltungssystemen

Zeitpunkt (h)	Käfighaltung		Volierenhaltung		Maststallhaltung	
0	T 1	-	T 1	-	H 1	-
					H 2	-
	T 2	-	T 2	-	H 3	-
					H 4	-
	T 3	-	T 3	-	H 5	-
					H 6	-
6	T 9	-	T 5	-		
	T 10	-	T 6	-		
	T 11	-	T 7	-		
12	T 17	-	T 13	-		
	T 18	-	T 14	-		
	T 19	-	T 15	+		
24	T 25	-	T 21	-	H 7	-
					H 8	-
	T 26	-	T 22	+	H 9	-
					H 10	-
	T 27	-	T 23	+	H 11	-
48					H 12	-
	T 33	-	T 29	+	H 13	+
					H 14	+
	T 34	-	T 30	+	H 15	+
					H 16	-
	T 35	-	T 31	+	H 17	+
72					H 18	-
	T 41	+	T 37	+		
	T 42	-	T 38	+		
168	T 43	-	T 39	+		
					H 19	+
	T 49	-	T 45	+	H 20	+
					H 21	+
	T 50	-	T 46	+	H 22	+
					H 23	+
	T 51	-	T 47	+	H 24	+

Obligate Anaerobier waren bei allen 3 Tiergruppen vorzufinden, wobei bei den Küken aus Volieren- und Käfighaltung kulturell ausschließlich Mukosaproben positiv für obligat anaerobe Keime waren, im Einzelnen bei vier physiologisch inokulierten und sechs keimarm gehaltenen Hühnern.

Bei den konventionell aufgezogenen Masttieren waren im Blinddarminhalt *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides fragilis* und *Bacteroides ovatus*, assoziiert zur Mukosa *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides fragilis* sowie *Clostridium* spp. zu detektieren. *Bacteroides* spp. konnten erstmals nach 7 Tagen nachgewiesen werden und waren zu diesem Zeitpunkt im Darminhalt von 5 und in der Mukosa von 2 der 6 beprobten Küken präsent.

1.2.2 Proben aus der Umwelt der Tiere

1.2.2.1 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Volieren- und Käfighaltung Bruteier

Bei der Untersuchung der Bruteier, die zum selben Zeitpunkt aus derselben Brüterei bezogen wurden wie die Eier aus denen später die Volierentiere sowie die Küken aus Käfighaltung schlüpften, konnten von den Eischalen *Acinetobacter lwoffii*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* sowie *Micrococcus luteus* und aus dem Eiinhalt *Acinetobacter radioresistens* isoliert und identifiziert werden. *Enterococcus faecalis* sowie *E. coli* waren anschließend sowohl bei Küken aus Volieren- als auch aus Käfighaltung nachweisbar, während *Acinetobacter lwoffii* lediglich bei Volierentieren detektiert wurde.

Einstreu

Das Keimspektrum der Einstreu, auf der zuvor Althennen gehalten wurden und die den Volierentieren zur Verfügung stand, umfasste *Acinetobacter lwoffii*, *E. coli*, *Ent. casseliflavus*, *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Lactobacillus reuteri* sowie *Arthrobacter arilaitensis*. Bis auf letzteren fanden sich alle Keime aus der Einstreu in den Darm-Mikrobiota der physiologisch inokulierten Tiere wieder.

1.2.2.2 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Maststallhaltung

Eischalen

Aus den Spüllösungen der Eischalen, welche dem Schlupfbrüter entnommen wurden in dem die beprobten Tiere schlüpften, waren keine Keime anzüchtbar. Somit entfiel die Differenzierung.

Futterproben

Bei der qualitativen Analyse des Futters von Tieren aus Maststallhaltung konnten *E. coli* (Kükenstarter), *Enterococcus hirae* (Aufzuchtfutter 1) sowie *Enterococcus gallinarum* (Aufzuchtfutter 2, Finisher) isoliert und identifiziert werden.

Trinkwasser

Aus Trinkwasserproben wurden *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* sowie *Brevundimonas diminuta* isoliert und identifiziert.

Transportkisten

Auch aus den Tupferproben von Transportkisten, in welchen die Küken aus Maststallhaltung von der Brüterei zur Farm transportiert wurden, konnten keine Bakterien angezüchtet werden, somit entfiel die Differenzierung.

1.2.3 Wildvögel

Aus den 20 aus Finnland übermittelten Kloakentupfern von Schneehühnern konnten – mit Ausnahme eines *E. coli*-Isolats – ausschließlich Enterokokken angezüchtet werden. Die Spezieszusammensetzung zeigt Tabelle 16.

Tabelle 16: Keimnachweis aus Tupfern vom Schneehuhn (Finnland)

Spezies	Untersuchte Tupfer (n)	Positive Tupfer (n)
<i>Ent. faecalis</i>	20	3
<i>Ent. faecium</i>	20	6
<i>Ent. mundtii</i>	20	7
<i>E. coli</i>	20	1

1.3 Phänotypische Resistenz ausgewählter Bakterien

1.3.1 Indikatorspezies *E. coli*

1.3.1.1 Tiere aus Volierenhaltung

E. coli-Isolate ($n = 88$), welche aus Blinddarminhalt sowie zäkaler Mukosa von Küken aus Volierenhaltung innerhalb deren erster Lebenswoche gewonnen worden waren, wurden durch Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) mittels Mikrodilutionsverfahren auf das Vorliegen phänotypischer Antibiotikaresistenzen untersucht. Dabei stammten 32 Isolate aus Proben, die zu den Zeitpunkten bis einschließlich 24 h genommen wurden, 56 Isolate wurden aus Tieren gewonnen, die zum Probennahmezeitpunkt ein Lebensalter von > 24 h und ≤ 7 Tagen aufwiesen.

Das Ergebnis der Untersuchung zeigt Abbildung 18. Hier wird deutlich, dass bereits an Tag 1 nach dem Schlupf bei Küken aus Volierenhaltung beträchtliche Resistenzraten nachweisbar waren; so zeigten sich hier z. B. gegenüber den Aminopenicillinen Amoxicillin (mit Clavulansäure $2 \mu\text{g/ml}$) und Ampicillin 72 bzw. 78 % der *E. coli*- Isolate resistent. Die Analyse der phänotypischen Resistenz ergab außerdem, dass sich für die Indikatorspezies *E. coli* bei physiologisch inokulierten Tieren aus Volierenhaltung von Tag 1 ($n = 32$) zu späteren Tagen (max. Tag 7, $n = 56$) abnehmende Resistenzraten ergaben. Besonders deutlich konnte dies für Doxycyclin beobachtet werden: während sich 44 % der *E. coli*-Isolate, welche innerhalb der ersten 24 h von Volierentieren isoliert wurden, als resistent erwiesen, zeigten nur noch 9 % der Isolate, welche zu späteren Zeitpunkten gewonnen wurden phänotypische Resistenz gegenüber diesem Wirkstoff. Auch gegenüber Streptomycin fiel die Resistenzrate der getesteten Isolate auffällig: von 28 % (Zeitpunkt ≤ 24 h) auf 2 % (Zeitpunkt > 24 h ≤ 7 Tage).

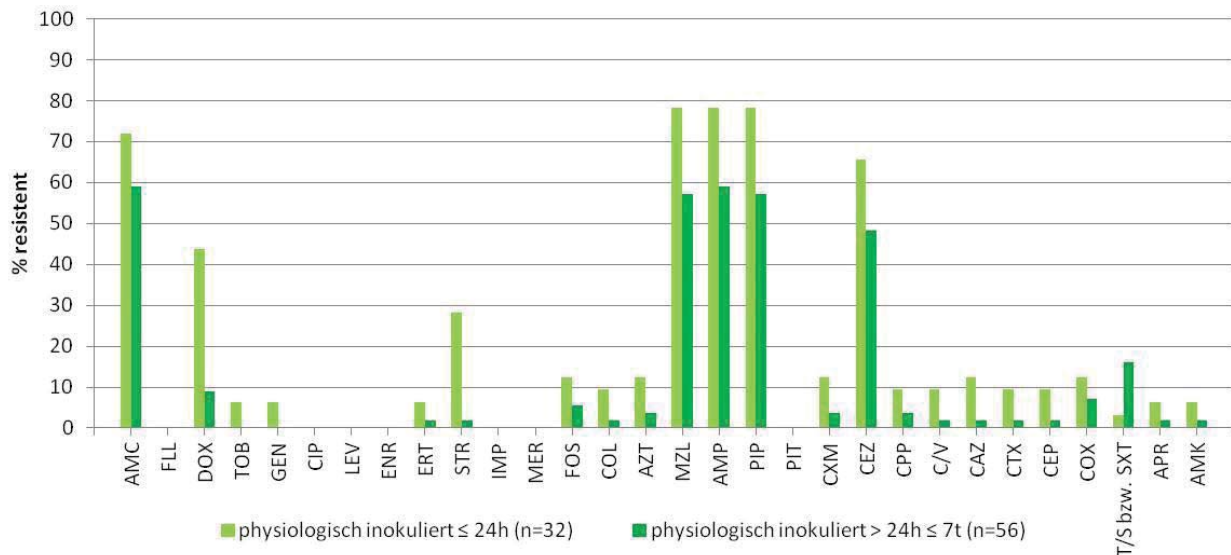


Abbildung 18: Resistenzraten von *E. coli*-Isolaten aus dem Zäkum von Küken aus Volierenhaltung zu den Probennahmezeitpunkten ≤ 24 Stunden und > 24 Stunden ≤ 7 Tage

Legende der Kürzel für untersuchte Antibiotika (*E. coli*)

Kürzel	Wirkstoff	Kürzel	Wirkstoff	Kürzel	Wirkstoff
AMC	Amoxicillin/Clavulansäure	COL	Colistin	GEN	Gentamicin
AMK	Amikacin	COX	Cefoxitin	IMP	Imipenem
AMP	Ampicillin	CPP	Cefpodoxim-Proxetil	LEV	Levofloxacin
APR	Apramycin	CTX	Cefotaxim	MER	Meropenem
AZT	Aztreonam	CXM	Cefuroxim	MZL	Mezlocillin
C/V	Cefpodoxim/Clavulansäure	DOX	Doxycyclin	PIP	Piperacillin
CAZ	Ceftazidim	ENR	Enrofloxacin	PIT	Piperacillin/Tazobactam
CEP	Cefepim	ERT	Ertapenem	STR	Streptomycin
CEZ	Cefazolin	FLL	Florfenicol	SXT	Trimethoprim/Sulfonamid
CIP	Ciprofloxacin	FOS	Fosfomycin	TOB	Tobramycin

1.3.1.2 Tiere aus Käfighaltung

Aus Proben der keimarm gehaltenen Käfigtiere wurden insgesamt lediglich 18 Isolate gewonnen und getestet, 8 Isolate stammten von Probennahmezeitpunkten ≤ 24 h, 10 weitere Isolate wurden aus Küken mit einem Lebensalter > 24 Stunden ≤ 7 Tage gewonnen. Orientierende Ergebnisse können Abbildung 19 entnommen werden.

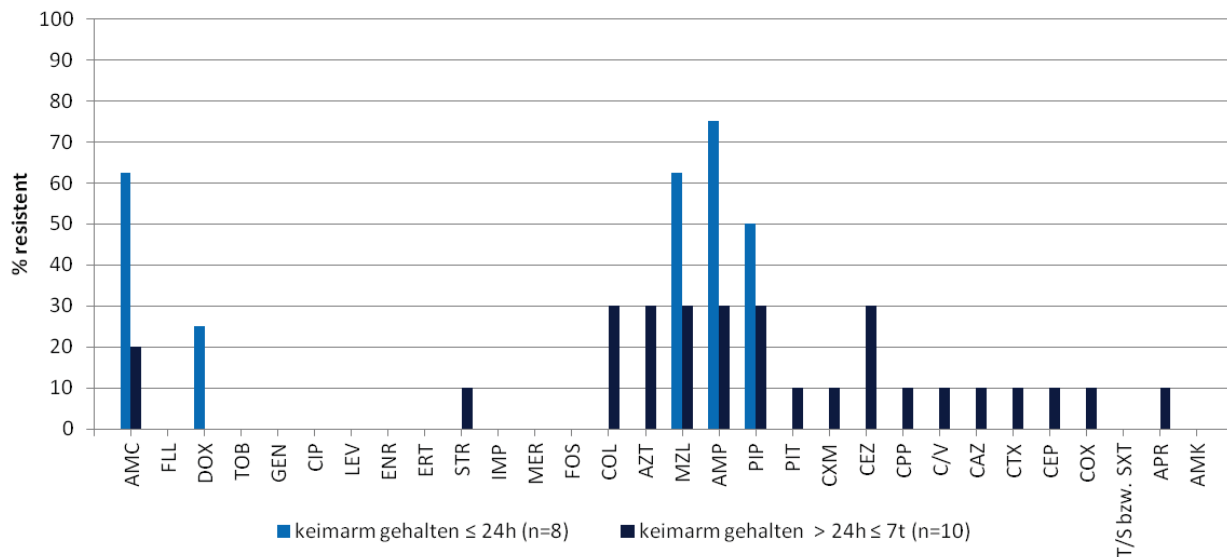


Abbildung 19: Resistenzraten von *E. coli*-Isolaten aus dem Zäkum von Küken aus Käfighaltung zu den Probennahmezeitpunkten ≤ 24 Stunden und > 24 Stunden ≤ 7 Tage

Legende vgl. Abbildung 18.

1.3.1.3 Tiere aus Maststallhaltung

Von den konventionell aufgezogenen Masttieren wurden ebenfalls 88 aus Zäkumproben isolierte *E. coli* auf das Vorliegen phänotypischer Antibiotikaresistenz getestet. Wie Abbildung 20 zeigt, wurden 48 Isolate vom Probennahmezeitpunkt 24 h und vom Zeitpunkt 7 Tage 40 *E. coli*-Isolate der MHK-Bestimmung unterzogen.

Auch bei Küken aus Maststallhaltung zeigten an Tag 1 isolierte *E. coli* gegen einige antimikrobielle Wirkstoffe beträchtliche Resistenzraten, sie lagen z. B. für Piperazillin und Ampicillin bei je 63 %. Innerhalb dieser Tiergruppe wiesen die geprüften *E. coli*-Isolate von Tag 1 ($n = 48$) zu Tag 7 ($n = 40$) teils erheblich zunehmende Resistenzraten auf, so stieg z. B. der Anteil resistenter *E. coli* für Trimethoprim/Sulfonamid von 17 auf 63 %. Auch gegenüber Cefazolin, einem Cephalosporin der 1. Generation, war ein deutlicher Anstieg der Resistenzrate zu beobachten: während 13 % der zum Zeitpunkt 24 h isolierten *E. coli* phänotypische Resistenz gegenüber diesem Wirkstoff zeigten war ihr Anteil nach 7 Tagen auf 38 % angestiegen.

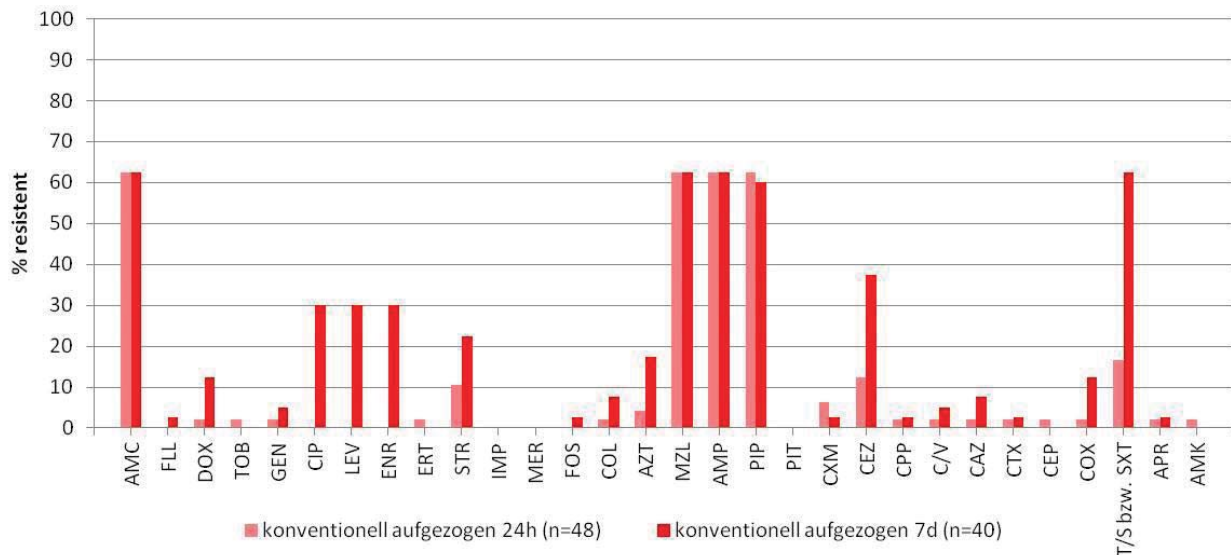


Abbildung 20: Resistenzraten von *E. coli*-Isolaten aus dem Zäkum von Küken aus Maststallhaltung zu den Probennahmezeitpunkten ≤ 24 Stunden und > 24 Stunden ≤ 7 Tage

Legende vgl. Abbildung 18.

1.3.2 Indikatorspezies *Enterococcus* spp.

Ent. faecium und *Ent. faecalis*-Isolate, welche aus Blinddarminhalt sowie zäkaler Mukosa von Küken aus Volieren- und Maststallhaltung innerhalb deren erster Lebenswoche gewonnen wurden, wurden durch Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) mittels Mikrodilutionsverfahren auf das Vorliegen phänotypischer Antibiotikaresistenzen getestet. Aufgrund der geringen Anzahl ($n = 3$ bzw. $n = 6$) wurden Isolate von Käfigtieren nicht in diese Darstellung einbezogen.

1.3.2.1 Tiere aus Volierenhaltung

Enterococcus faecalis

Ergebnisse der phänotypischen Resistenzuntersuchung von *Ent. faecalis*-Isolaten fasst Abbildung 21 zusammen.

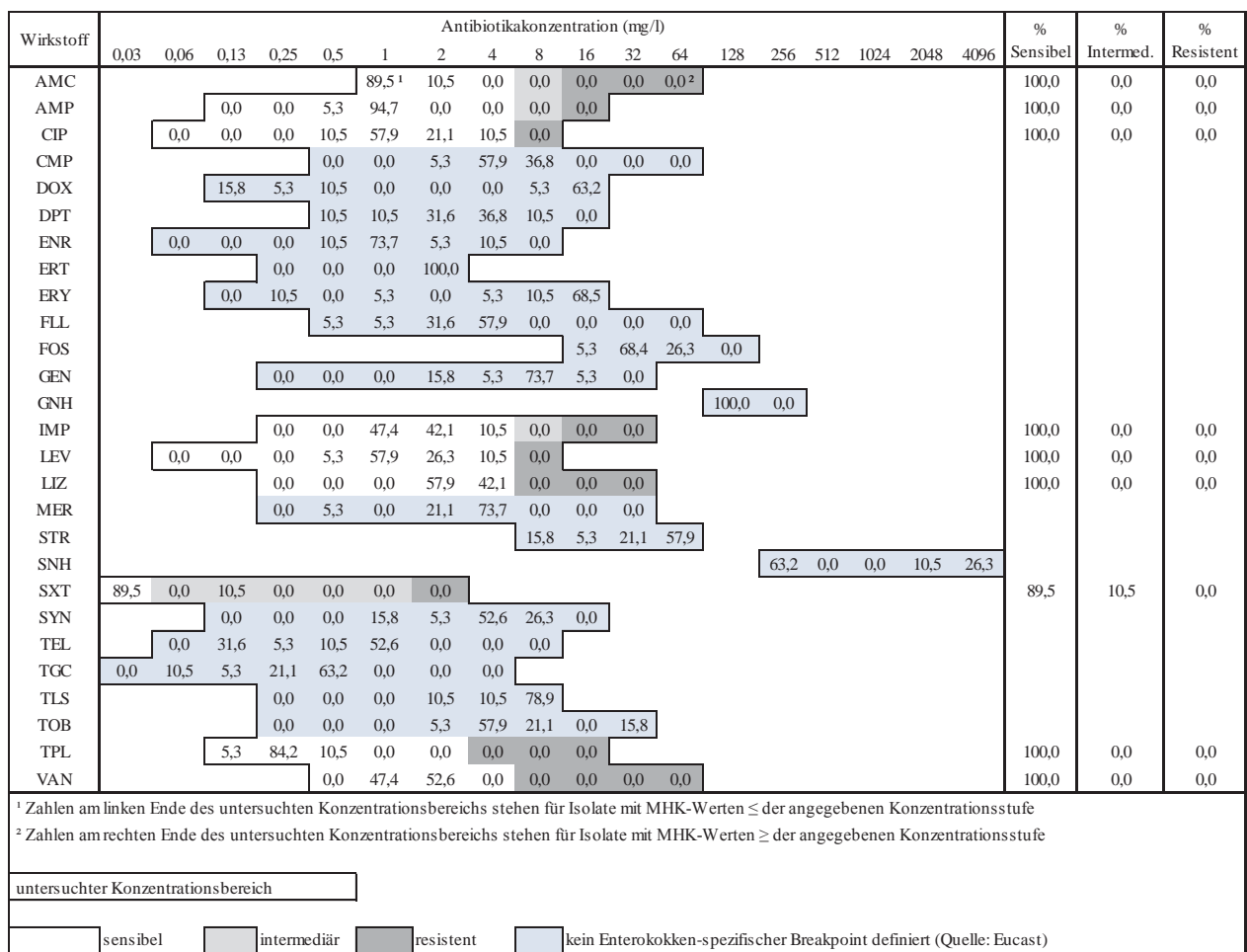


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Ent. faecalis*-Isolaten (n = 19) aus Zäkumproben von Küken aus Volierenhaltung (≤ 7 Tage)

Legende der Kürzel für untersuchte Antibiotika (*Enterococcus* spp.)

Kürzel	Wirkstoff	Kürzel	Wirkstoff	Kürzel	Wirkstoff
AMC	Amoxicillin/Clavulansäure	FOS	Fosfomycin	SXT	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
AMP	Ampicillin	GEN	Gentamicin	TEL	Telithromycin
CIP	Ciprofloxacin	GNH	Gentamicin high level	TGC	Tigecyclin
CMP	Chloramphenicol	IMP	Imipenem	TLS	Tylosin
DOX	Doxycyclin	LEV	Levofloxacin	TOB	Tobramycin
DPT	Daptomycin	LIZ	Linezolid	TPL	Teicoplanin
ENR	Enrofloxacin	MER	Meropenem	VAN	Vancomycin
ERT	Ertapenem	SNH	Streptomycin high level		
ERY	Erythromycin	STR	Streptomycin		
FLL	Florfenicol	SYN	Synercid		

Ausnahmslos alle getesteten Isolate waren empfindlich gegenüber den Fluorquinolonen Ciprofloxacin und Levofloxacin. Auch gegenüber den Aminopenicillinen Ampicillin und Amoxicillin (letzteres in Kombination mit Clavulansäure) sowie gegen Imipenem, Linezolid, Teicoplanin und Vancomycin

zeigten sich sämtliche geprüfte Isolate sensibel. Aufgrund ermittelter MHK-Werte wurden 89,5 % getesteten *Ent. faecalis*-Isolate (n = 19) dieser Tiergruppe gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol als sensibel eingestuft.

Enterococcus faecium

Die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzuntersuchung von *Ent. faecium* Isolaten fasst Abbildung 22 zusammen.

Wirkstoff	Antibiotikakonzentration (mg/l)																		%	%	%
	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	Sensibel	Intermed.	Resistent
AMC						23,8 ¹	4,8	71,4	0,0	0,0	0,0	0,0 ²							100,0	0,0	0,0
AMP			0,0	0,0	0,0	23,8	4,8	9,5	61,9	0,0									38,1	61,9	0,0
CIP		0,0	0,0	0,0	4,8	0,0	57,1	19,0	19,0										81,0	0,0	19,0
CMP					0,0	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	0,0									
DOX			23,8	4,8	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	66,7											
DPT					4,8	4,8	57,1	33,3	0,0	0,0											
ENR		0,0	0,0	0,0	0,0	9,5	14,3	57,1	19,0												
ERT				0,0	0,0	0,0	100,0														
ERY			0,0	0,0	0,0	0,0	9,5	85,7	0,0	4,8											
FLL					0,0	4,8	4,8	90,5	0,0	0,0	0,0	0,0									
FOS										9,5	57,1	33,3	0,0								
GEN				0,0	0,0	0,0	9,5	52,4	38,1	0,0	0,0										
GNH													100,0	0,0							
IMP				0,0	0,0	19,0	0,0	47,6	28,6	4,8	0,0								66,7	28,6	4,8
LEV		0,0	0,0	0,0	0,0	4,8	52,4	28,6	14,3										85,7	0,0	14,3
LIZ				0,0	0,0	0,0	90,5	9,5	0,0	0,0	0,0								100,0	0,0	0,0
MER				0,0	0,0	0,0	0,0	23,8	4,8	61,9	9,5										
STR									0,0	4,8	57,1	38,1									
SNH														100,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
SXT	28,6	23,8	4,8	19,0	9,5	4,8	9,5												28,6	61,9	9,5
SYN			0,0	0,0	4,8	90,5	0,0	4,8	0,0	0,0											
TEL		0,0	38,1	57,1	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0												
TGC	0,0	19,0	71,4	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0													
TLS				0,0	0,0	0,0	76,2	19,0	4,8												
TOB				0,0	0,0	0,0	0,0	14,3	81,0	4,8	0,0										
TPL			0,0	71,4	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0									100,0	0,0	0,0
VAN					95,2	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0							100,0	0,0	0,0

¹ Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≤ der angegebenen Konzentrationsstufe

² Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≥ der angegebenen Konzentrationsstufe

untersuchter Konzentrationsbereich

sensibelintermediärresistentkein Enterokokken-spezifischer Breakpoint definiert (Quelle: Eucast)

Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Ent. faecium*-Isolaten (n = 21) aus Zäkumproben von Küken aus Volierenhaltung (≤ 7 Tage)

Ent. faecium-Isolate (n = 21) aus Proben der physiologisch inokulierten Hühner wiesen Resistenzen gegen Ciprofloxacin (19,0 %), Levofloxacin (14,3 %) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (9,5 %) auf.

1.3.2.2 Tiere aus Maststallhaltung

Enterococcus faecalis

Abbildung 23 können die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzuntersuchung von *Ent. faecalis*-Isolaten entnommen werden.

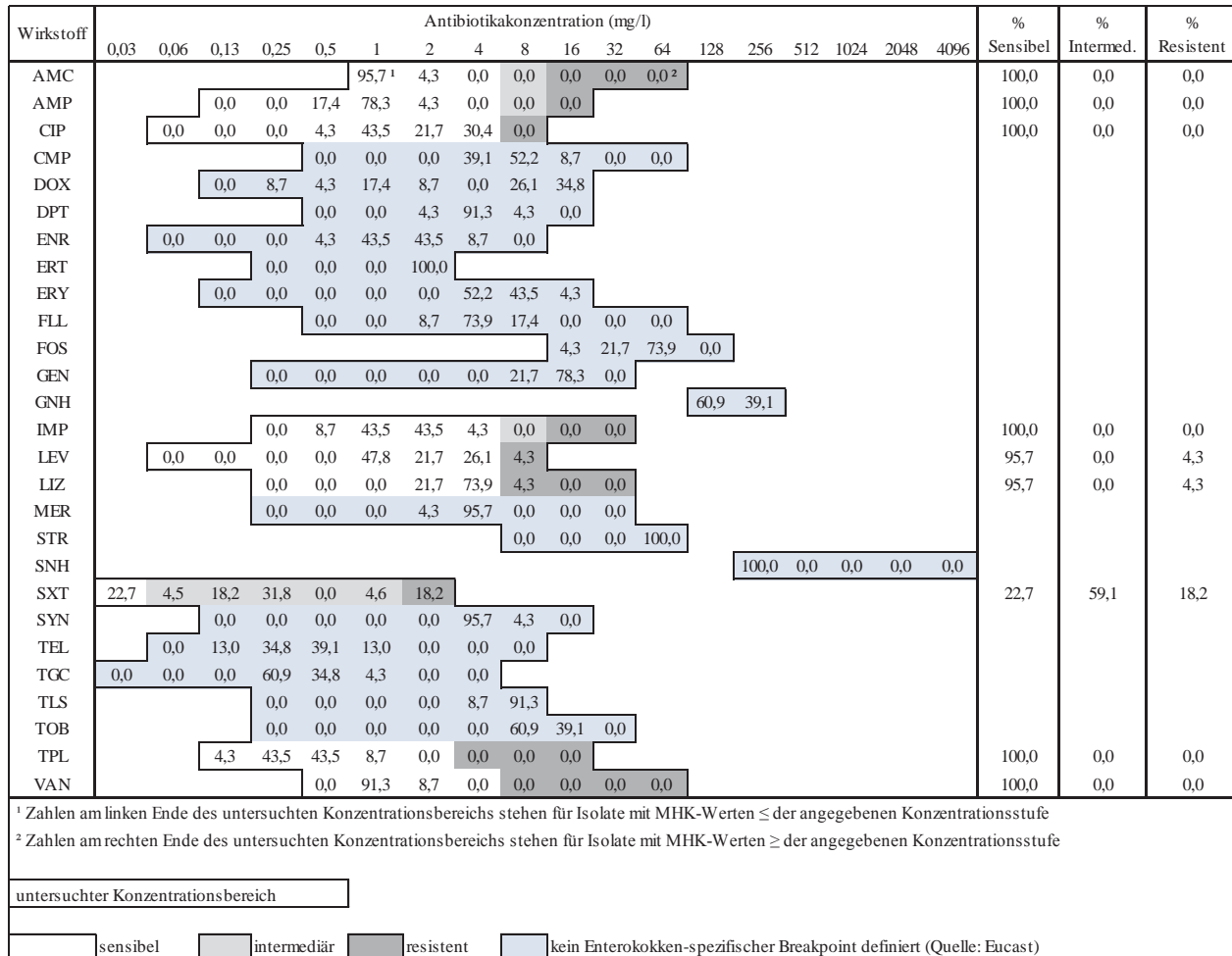


Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Ent. faecalis*-Isolaten (n = 23) aus Zäkumproben von Küken aus Maststallhaltung (≤ 7 Tage)

Unter den überprüften *Ent. faecalis*-Isolaten (n = 23), gewonnen aus Zäkumproben konventionell aufgezogener Hühner, waren 18,2 % resistent gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Gute Wirksamkeit zeigten hier Amoxicillin (mit Clavulansäure), Ampicillin, Imipenem, Teicoplanin und Vancomycin: sämtliche überprüften Isolate waren gegenüber diesen Antibiotika sensibel. Phänotypische Resistenz gegen Ciprofloxacin war ebenfalls nicht nachweisbar, gegenüber Levofloxacin erwiesen sich 4,3 % der getesteten *Ent. faecalis*-Isolate als resistent.

Enterococcus faecium

Abbildung 24 stellt die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzuntersuchung von *Ent. faecium*-Isolaten dar.

Wirkstoff	Antibiotikakonzentration (mg/l)																		% Sensibel	% Intermed.	% Resistent
	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096			
AMC						20,8 ¹	58,3	8,3	4,2	8,3	0,0	0,0 ²							87,5	4,2	8,3
AMP			0,0	0,0	0,0	12,5	37,5	45,8	4,2	0,0									95,8	4,2	0,0
CIP		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,8	41,7	37,5										62,5	0,0	37,5
CMP					0,0	8,3	0,0	25,0	37,5	29,2	0,0	0,0									
DOX			12,5	41,7	16,7	16,7	0,0	4,2	8,3	0,0											
DPT					0,0	20,8	29,2	41,7	8,3	0,0											
ENR		0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	16,7	16,7	62,5												
ERT				0,0	0,0	4,2	95,8														
ERY			0,0	4,2	8,3	4,2	8,3	33,3	0,0	41,7											
FLL					0,0	8,3	4,2	83,3	4,2	0,0	0,0	0,0									
FOS										0,0	20,8	66,7	12,5								
GEN				0,0	0,0	0,0	4,2	33,3	54,2	8,3	0,0										
GNH													100,0	0,0							
IMP				0,0	0,0	4,3	17,4	65,2	13,0	0,0	0,0								87,0	13,0	0,0
LEV		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,8	62,5	16,7										83,3	0,0	16,7
LIZ				0,0	0,0	0,0	70,8	29,2	0,0	0,0	0,0								100,0	0,0	0,0
MER				0,0	0,0	4,2	4,2	16,7	50,0	25,0	0,0										
STR									4,2	8,3	37,5	50,0									
SNH													58,3	8,3	8,3	20,8	4,2				
SXT	16,7	8,3	8,3	4,2	0,0	4,2	58,3												16,7	25,0	58,3
SYN			0,0	8,3	4,2	62,5	20,8	4,2	0,0	0,0											
TEL		4,2	12,5	12,5	45,8	4,2	20,8	0,0	0,0												
TGC		0,0	8,3	54,2	37,5	0,0	0,0	0,0	0,0												
TLS				0,0	0,0	0,0	33,3	12,5	54,1												
TOB				0,0	0,0	0,0	4,2	4,2	16,7	37,5	37,5										
TPL			8,3	12,5	50,0	29,2	0,0	0,0	0,0	0,0									100,0	0,0	0,0
VAN					66,7	16,7	12,5	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0							100,0	0,0	0,0

¹ Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≤ der angegebenen Konzentrationsstufe

² Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≥ der angegebenen Konzentrationsstufe

untersuchter Konzentrationsbereich

sensibelintermediärresistentkein Enterokokken-spezifischer Breakpoint definiert (Quelle: Eucast)

Abbildung 24: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Ent. faecium*-Isolaten (n = 24) aus Zäkumproben von Küken aus Maststallhaltung

Unter den mittels MHK-Wertbestimmung geprüften Keimen aus Proben konventionell aufgezogener Masttiere erwiesen sich 8,3 % der *Ent. faecium*-Isolate als resistent gegen Amoxicillin (in Kombination mit Clavulansäure). Gegenüber Ampicillin waren 95,8 % sensibel, 4,2 % wiesen intermediäre Resistenzen auf.

16,7 % der geprüften *Ent. faecium*-Isolate (n = 24) aus Proben dieser Tiergruppe zeigten sich sensibel gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol: 58,3 % der getesteten Isolate erwiesen sich gegenüber dieser Wirkstoffkombination als resistent.

Gegenüber Linezolid, Teicoplanin und Vancomycin war keine phänotypische Resistenz nachweisbar.

1.4 PCR-SSCP-Analyse des Mikrobioms von Tieren aus unterschiedlichen Haltungsformen

Die Proben der Tiere aus Volieren- und keimarmer Käfighaltung sowie die der Hühner aus konventioneller Maststallhaltung wurden mittels SSCP Methode analysiert. Die Untersuchung erfolgte für jede Probe in zwei getrennten Ansätzen – einmal für den Zäkuminhalt und einmal für das Mukosa-assoziierte Mikrobiom. Ausgewählte Banden wurden durch Sequenzierung näher bestimmt; außerdem erfolgte eine Auswertung der Gele mit Hilfe des Programms Gel Compar II.

Bei der vergleichenden Betrachtung der SSCP-Gele ist zu beachten, dass die Untersuchung der Blinddarmproben von Küken aus Maststallhaltung nach einer 0 h-Beprobung erst zum Zeitpunkt 24 h fortgesetzt wurde.

1.4.1 Tiere aus Volierenhaltung

Mikrobiom im Darminhalt

Die Entfaltung der mikrobiellen Diversität bei physiologisch inokulierten Tieren aus Volierenhaltung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 h zeigen die entsprechenden Abbildungen im Anhang.

Innerhalb dieser Tiergruppe wiesen Proben des zäkalen Darminhalts der beprobten Hühner zu frühen Zeitpunkten (0 h, 6 h, 12 h) eine geringe Vielfalt im Bandenmuster der SSCP-Gelanalyse auf. Direkt nach dem Schlupf (Zeitpunkt 0 h) war bei nur einer Probe (Probe T 1 K) der Volierentiere eine geringe Anzahl Banden zu sehen, alle auf einer Höhe zwischen der Laufweite von *Klebsiella* sp. und *Corynebacterium* sp. des Speziesstandards.

Zum Zeitpunkt 6 h waren bei keinem der drei beprobten Tiere klare Banden im Polyacrylamidgel nachweisbar.

Nach 12 h entwickelten zwei Darminhaltproben eine deutlich sichtbare Bande (auf einer Höhe zwischen der Laufweite von *Mycoplasma* sp. und *Helcococcus* sp. des Speziesstandards) im SSCP-Gel. Zum selben Probennahmezeitpunkt konnte bei dem dritten Tier (Probe T 13 K) eine deutliche Bande (auf einer Höhe zwischen der Laufweite von *Corynebacterium* sp. und *E. coli* des Speziesstandards) detektiert werden. Bei dieser Probe trat nun auch erstmals

während der Beprobung eine ausgeprägte Bande auf Höhe der Laufweite von *E. coli* des Speziesstandards in Erscheinung.

Wie Abbildung 25 zeigt konnte das Auftreten dieser Bande im SSCP-Gel nach 24 h für den Darminhalt aller drei beprobten Tiere beobachtet werden, zudem stieg die Diversität in den Bandenprofilen.

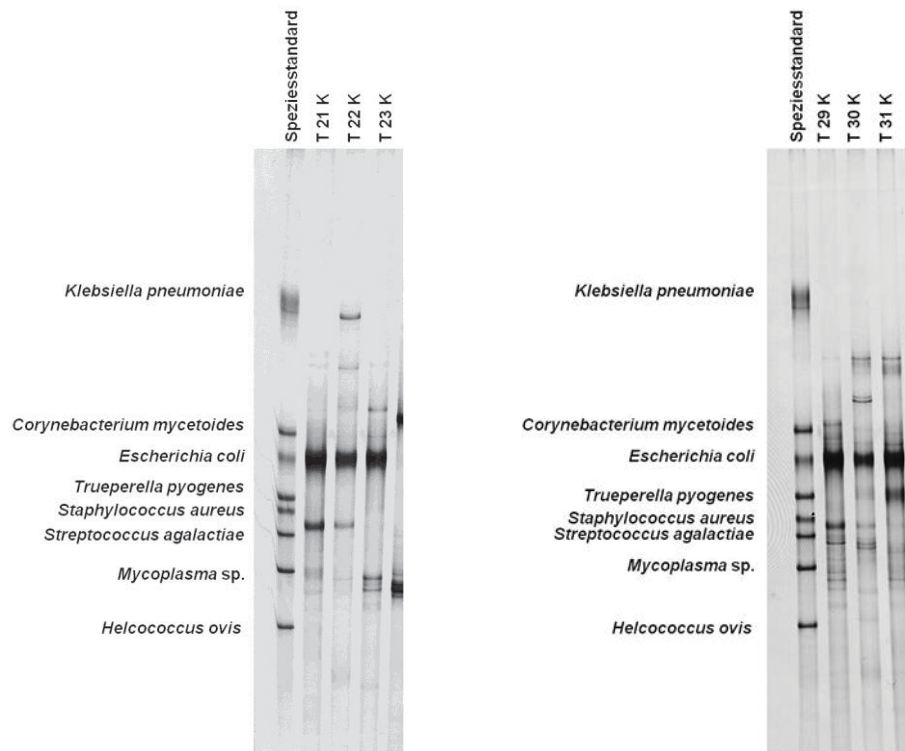


Abbildung 25: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 24 h (T 21 K-T 23 K) und 48 h (T 29 K-T 31 K)

Diese Vielfalt in der Zusammensetzung des Mikrobioms nahm augenscheinlich innerhalb der nächsten 24 h weiter zu. Zudem waren auch zum Zeitpunkt 48 h intensive Banden auf einer Höhe von *E. coli* des Speziesstandards für den Darminhalt der Tiere nachweisbar (vgl. Abbildung 25).

Wie in Abbildung 26 dargestellt zeigten physiologisch inokulierte Küken (Volierenhaltung) nach 72 h Lebensdauer eine relativ große Diversität im Bandenprofil der Proben ihres zäkalen Darminhalts. Dabei ließ die Bande auf Höhe von *E. coli* im Polyacrylamidgel, verglichen mit den nach 48 h gewonnen Proben, zwar etwas an Intensität nach, war jedoch bei allen drei zum Zeitpunkt 72 h beprobten Tieren vorhanden. Außerdem kamen nun ebenfalls bei allen drei Hühnern mehrere sehr deutlich ausgeprägte Banden (auf einer Höhe zwischen der Laufweite von *Staphylococcus sp.* und *Mycoplasma sp.*) hinzu.

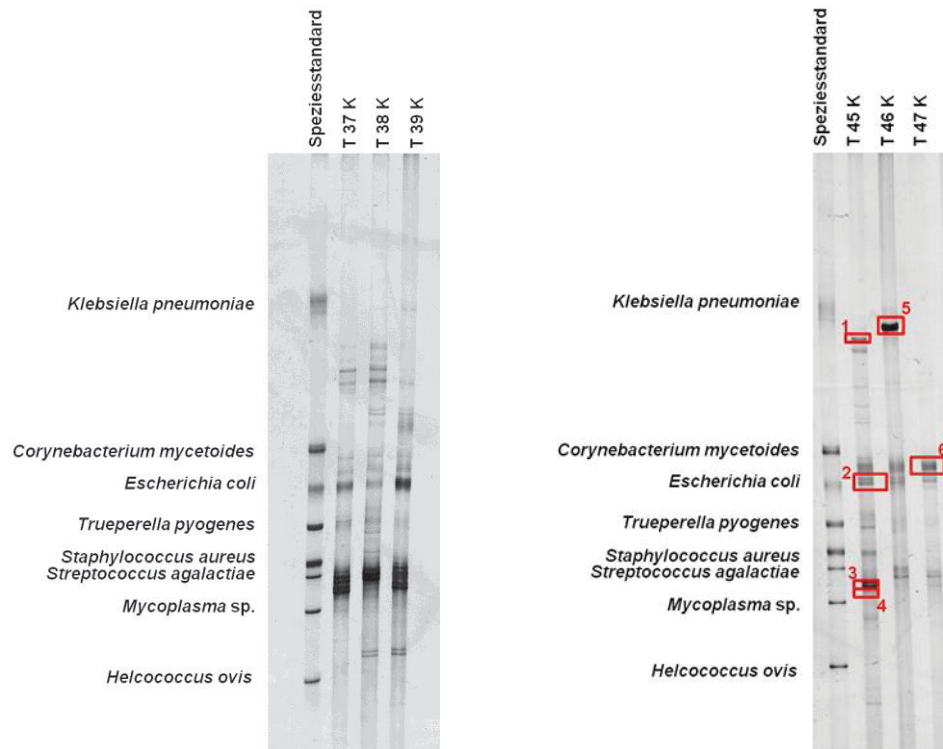


Abbildung 26: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 72 h (T 37 K-T 39 K) und 7 Tage (T 45 K-T 47 K)

Wie Abbildung 26 zeigt fielen diese Banden bei den 7 Tage alten Tieren wieder unter die Nachweisgrenze im SSCP-Gel oder ließen an Intensität nach. Auch die Bande auf Höhe von *E. coli* war nicht mehr klar nachzuweisen, andererseits traten neue Banden auf anderen Laufweiten des SSCP-Gels auf.

Um das zäkale Mikrobiom der 7 Tage alten Jungtiere aus Volierenhaltung – vergleichend zu gleichaltrigen Küken aus Maststallhaltung – näher zu definieren, wurden ausgewählte Banden dieser Proben sequenziert. Dadurch konnten beträchtliche Unterschiede dominierender Gensequenzen im Mikrobiom der Küken verdeutlicht werden, lediglich *Bacteroides dorei/fragilis* trat nachweislich in beiden Tiergruppen auf. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel von 7 Tage alten Küken aus Volierenhaltung sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Zäkales Darmmikrobiom von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden

Banden- position	Nachweis bei konventionell gehaltenen Tieren	Übereinstimmung (%) mit	Accession Nr. NCBI
1v	-	97 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ACOP02000011
2v	-	100 <i>Barnesiella</i> sp.	KJ572412.1
3v = 4v	-	100 <i>Alistipes onderdonkii</i>	AB554231.1
		100 <i>Alistipes finegoldii</i>	AY643082.1
		100 <i>Bacteroides</i> sp.	AJ518872.1
5v	Ja	100 <i>Bacteroides dorei</i>	CP008741
6v	-	100 <i>Coprobacter fastidiosus</i>	NR_118316.1

Insgesamt wiesen die Küken zu den einzelnen Probennahmezeitpunkten Übereinstimmungen in den Bandenmustern ihrer Fäzesproben auf. Daneben waren aber auch bei Einzeltieren individuell auftretende Banden zu sehen.

Mukosa-assoziiertes Mikrobiom

SSCP-Gelprofile des Mukosa-assoziierten Mikrobioms der zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h untersuchten physiologisch inokulierten Küken aus Volierenhaltung sind im Anhang abgebildet.

Wie die Abbildung 27 darstellt wiesen die Mukosa-assoziierten Mikrobiota der Küken, welche nach dem Schlupf Kontakt zu Althennenkot hatten, innerhalb der ersten 12 h zum großen Teil optisch übereinstimmende Bandenprofile auf. So zeigten die meisten Proben dieser Tiergruppe eine Bande ausgeprägter Intensität auf einer Höhe zwischen der Laufweite von *Klebsiella* sp. und *Corynebacterium* sp. des Speziesstandards. Außerdem konnten weitere übereinstimmende Banden von geringerer Stärke im SSCP-Gel nachgewiesen werden.

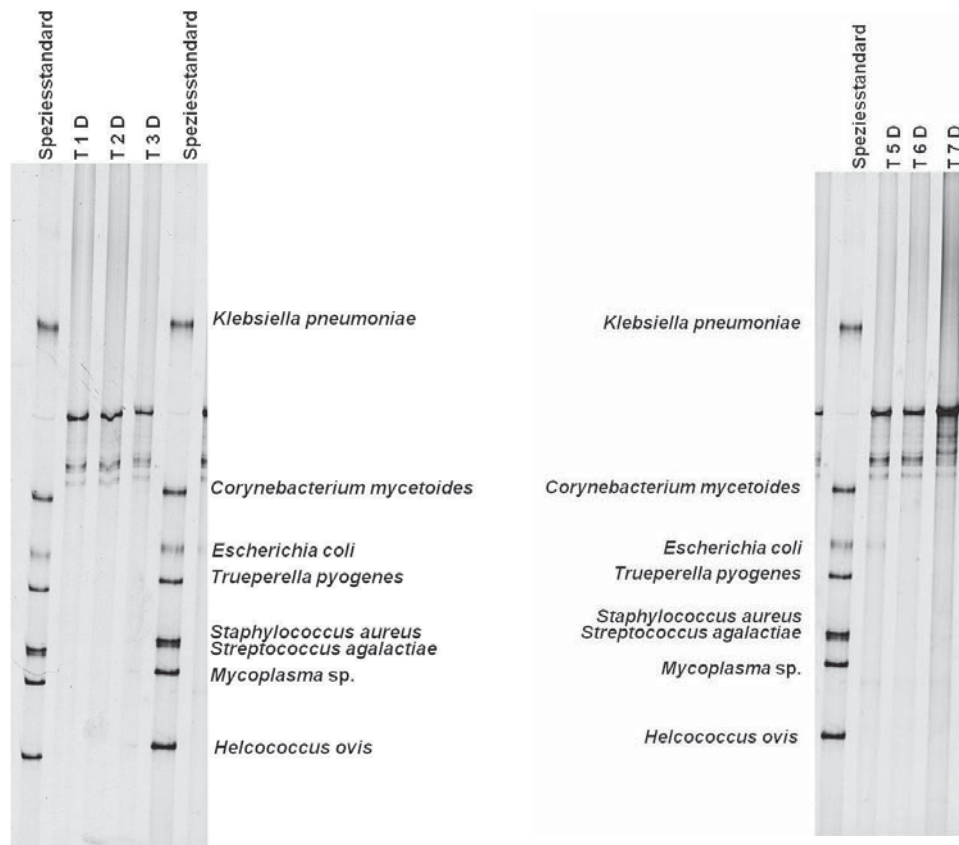


Abbildung 27: SSCP-Analyse des Mukosa-asoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 D-T 3 D) und 6 h (T 5 D-T 7 D)

Lediglich das Mikrobiom der zäkalen Mukosa von Huhn T 14 stellte sich im Polyacrylamidgel augenscheinlich abweichend dar und wies außerdem eine deutliche Bande auf Höhe von *E. coli* des Speziesstandards auf.

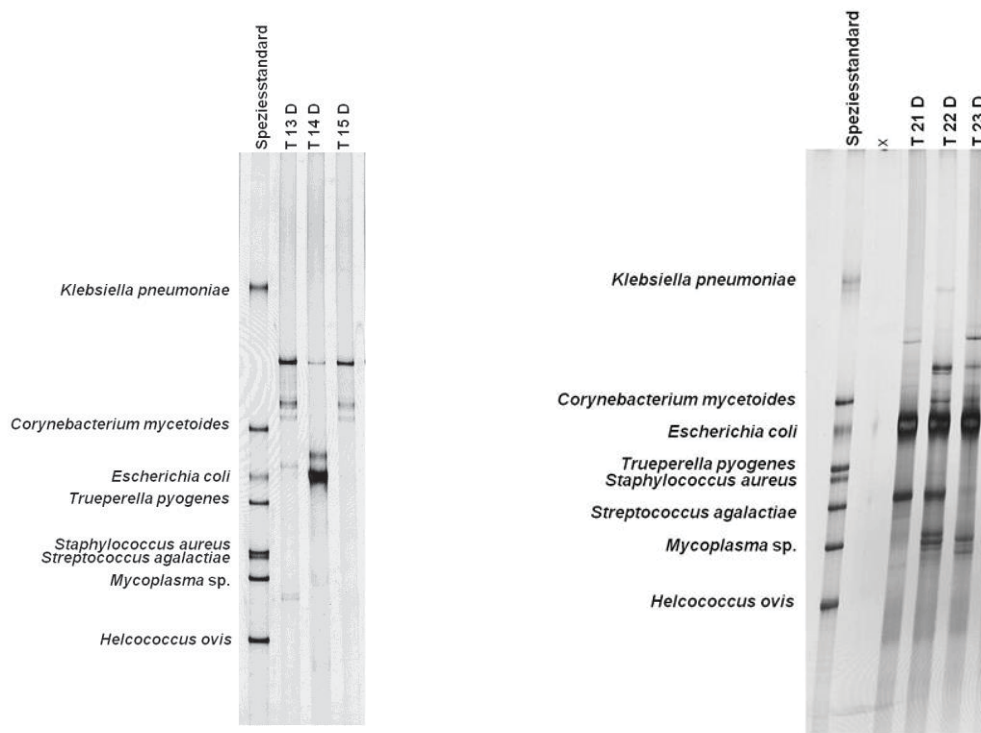


Abbildung 28: SSCP-Analyse des Mukosa-asoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 13 D-T 15 D) und 24 h (T 21 D-T 23 D)

Wie Abbildung 28 zeigt konnte diese Bande auf Höhe von *E. coli* zum Zeitpunkt 24 h bei allen drei untersuchten Küken detektiert werden.

Auch nach 48 h bleibt die Bande auf Höhe von *E. coli* bei sämtlichen beprobten Tieren erhalten, Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Küken im Muster der SSCP-Gelanalyse sowohl untereinander übereinstimmende, als auch bei Einzeltieren individuell auftretende Banden auf. Nach 72 h sowie nach 7 Tagen fiel die Bande auf Höhe von *E. coli* zum Teil unter die Nachweisgrenze im SSCP-Gel, während sie im Gelmuster einiger Tiere mit deutlich verminderter Intensität wahrgenommen werden konnte. Auch hier verschwanden einzelne Banden, die zu früheren Zeitpunkten vorhanden waren, es kamen jedoch auch neue hinzu (Abbildung 29).

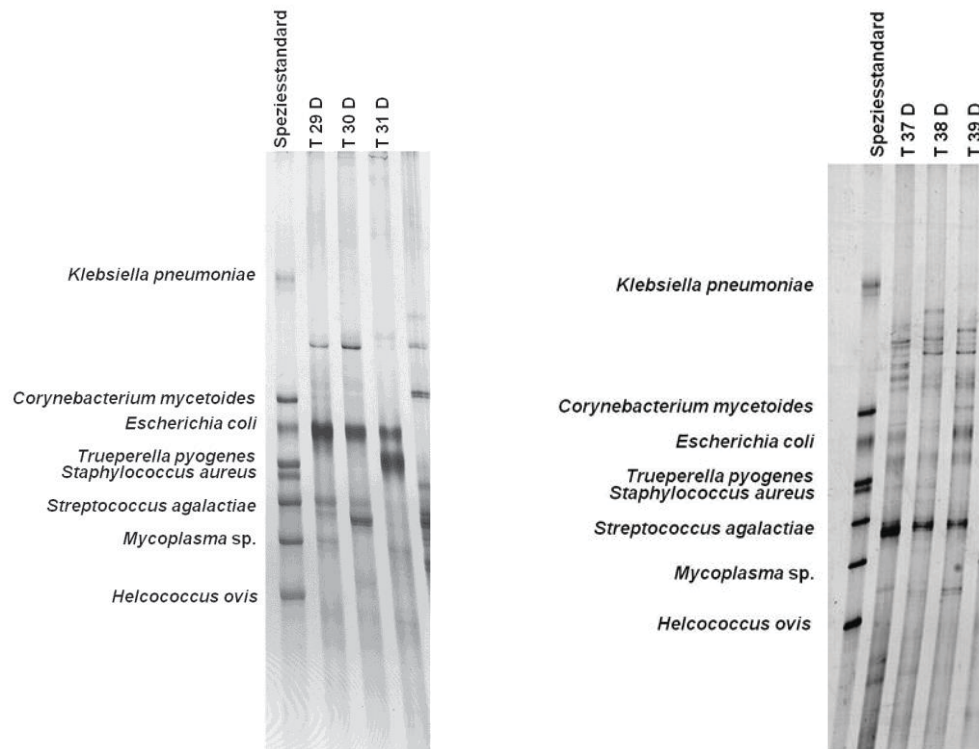


Abbildung 29: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 29 D-T 31 D) und 72 h (T 37 D-T39 D)

Für eine nähere Charakterisierung des mukosalen Mikrobioms der 7 Tage alten Hühner wurden dominante Banden aus dem Polyacrylamidgel ausgewählt, ausgeschnitten und sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in Tabelle 18 dargestellt. Auch für die Mukosa werden Unterschiede im Mikrobiom von Küken aus Volieren- und Maststallhaltung deutlich: nur *Bacteroides dorei/fragilis* und *Ruminococcus* spp. wurden übereinstimmend bei beiden Tiergruppen nachgewiesen.

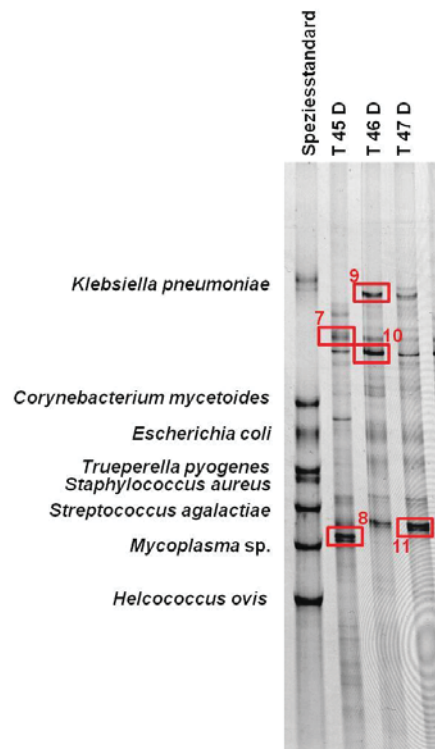


Abbildung 30: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage (T 45 D-T 47 D)

Tabelle 18: Mukosa-assoziierte Mikrobiota von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden

Banden- position	Nachweis bei konventionell gehaltenen Tieren	Übereinstimmung (%) mit	Accession Nr. NCBI
7v	-	96 <i>Clostridium</i> sp.	AF067965
8v	-	99 <i>Ruminococcus torques</i>	AB910746.1
9v= 5v	Ja	100 <i>Bacteroides dorei</i>	CP008741.1
10v	-	99 <i>Gallus gallus</i> isolate	HQ873432.1
11v	Ja	98 <i>Ruminococcus</i> sp.	AJ315979.1
		97 <i>Ruminococcus torques</i>	AB910746.1

1.4.2 Proben aus der Umwelt von Tieren aus Volierenhaltung

Einstreu mit Dung von Althennen

Das SSCP-Gel der Einstreu, die den Tieren aus Volierenhaltung zur Verfügung stand ist in Abbildung 31 dargestellt.

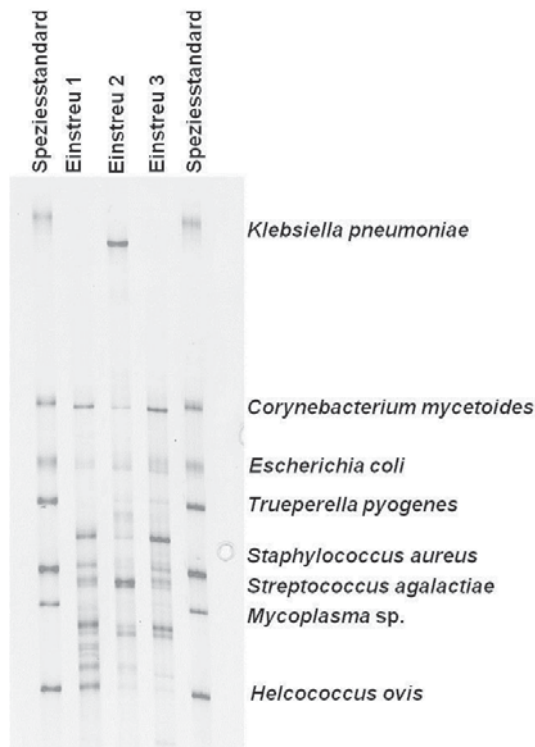


Abbildung 31: SSCP-Analyse der Einstreu (Volierenhaltung)

Im Bandenmuster der Einstreu von Tieren aus Volierenhaltung zeigte sich bei allen drei Proben eine Bande auf der Höhe der Laufweite von *E. coli* des Speziesstandards. Diese konnte auch bei physiologisch inokulierten Küken aus Volierenhaltung detektiert werden. Hingegen trat die Bande knapp unterhalb der Laufweite von *Corynebacterium mycetoides*, welche ebenfalls in allen drei Einstreuproben sichtbar wurde, bei den Volierentieren nicht in Erscheinung.

1.4.3 Tiere aus Käfighaltung

Mikrobiom im Darminhalt

Die anhand der PCR-SSCP-Technik dargestellte Diversität des intestinalen Mikrobioms von keimarm gehaltenen Küken (Käfighaltung) zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24 und 48 h ist den Abb. im Anhang zu entnehmen.

Unter den Proben des zäkalen Darminhalts der Käfigtiere konnten zu frühen Zeitpunkten (0 h, 6 h, 12 h) bei lediglich einer Probe (T 1 K) klar sichtbare Banden im SSCP-Gel nachgewiesen werden. Dies änderte sich nach 24 h: hier wiesen alle drei beprobten Tiere eine intensiv ausgeprägte Bande (auf einer Höhe zwischen den Laufweiten von *Klebsiella sp.* und *Corynebacterium sp.* des

Speziesstandards) auf. Außerdem traten bei zwei Proben (T 25 K und T 27 K) weitere deutliche Banden in Erscheinung.

Die Diversität im Bandenmuster der Polyacrylamidgele erhöhte sich zum Zeitpunkt 48 h trotz keimarmer Haltung sichtbar. Die Tiere zeigten neben übereinstimmenden auch individuelle Banden in den SSCP-Gelprofilen ihres Darminhaltes. Wie Abbildung 32 zeigt kann dies auch zu den späteren Probennahmzeitpunkten (72 h, 7 Tage) beobachtet werden (Abb. im Anhang).

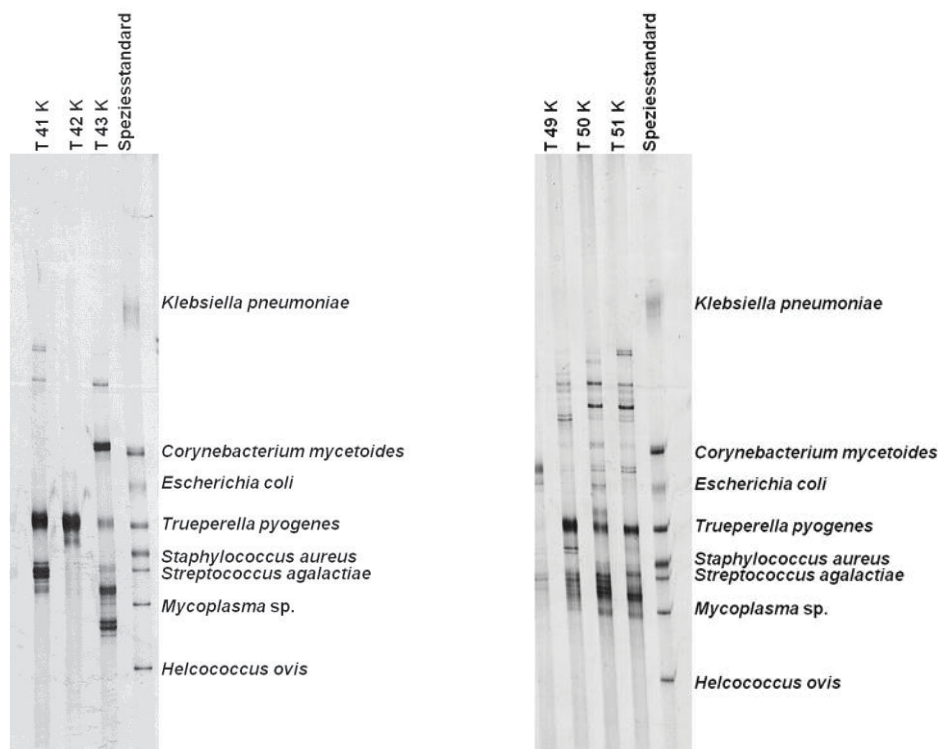


Abbildung 32: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 72 h (T 41 K-T 43 K) und 7 Tage (T 49 K-T 51 K)

Mukosa-assoziiertes Mikrobiom

Die Darstellung von SSCP-Gelen, welche Mukosaproben von Tieren aus Käfighaltung zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h, 24 h und 7 Tage zeigen, können der Abb. im Anhang entnommen werden. Wie bereits bei den Küken aus Volierenhaltung beobachtet, waren sich auch die Bandenprofile von Proben der zäkalen Mukosa bei den keimarm gehaltenen Käfigtieren innerhalb der ersten 12 Lebensstunden optisch sehr ähnlich, wobei nur wenige deutlich gezeichnete Banden im Polyacrylamidgel nachweisbar waren.

Anhand Abbildung 33 wird deutlich, dass sich die Diversität der Bandenmuster nach 48 h deutlich komplexer zeigte.

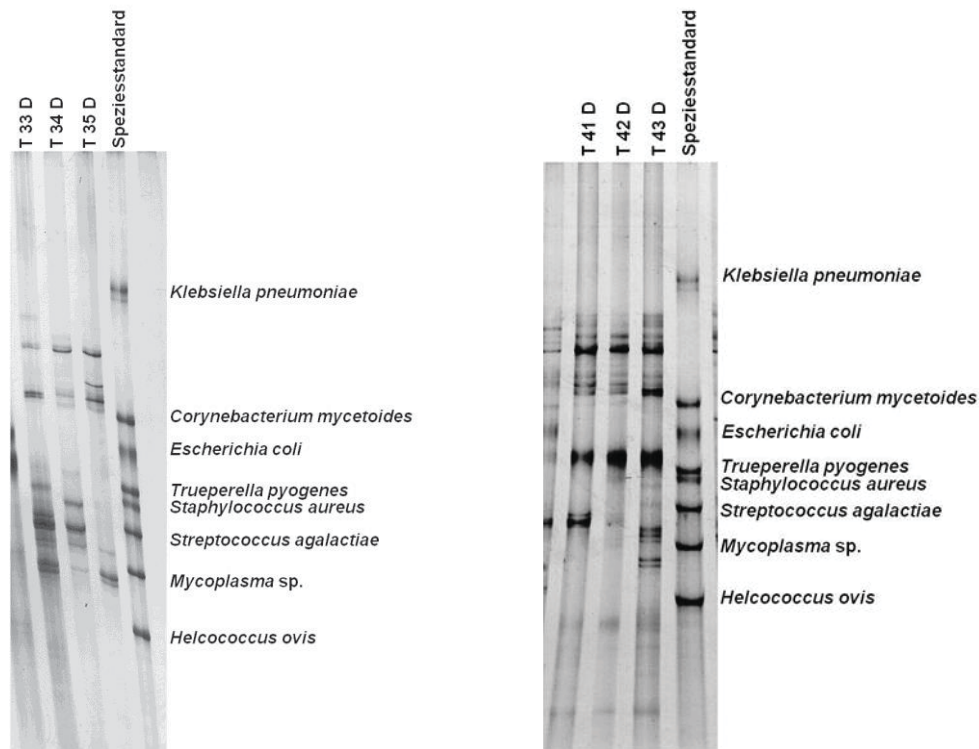


Abbildung 33: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 33 D-T35 D) und 72 h (T 41 D-T 43 D)

Auch innerhalb dieser Tiergruppe unterlagen die SSCP-Gelprofile der Mukosa-assoziierten Mikrobiota gewissen Schwankungen: Banden, die zu früheren Zeitpunkten der Probennahme nachweisbar waren, konnten zum Teil bei später beprobten Küken nicht detektiert werden. Andererseits traten trotz der keimarmen Haltungsbedingungen immer wieder neue Banden zu anderen Zeitpunkten in den SSCP-Gelen auf (Abbildung 33).

1.4.4 Tiere aus Maststallhaltung

Mikrobiom im Darminhalt

Bei der Betrachtung der SSCP-Gele dieser Tiergruppe zeigte sich, dass die Bandenmuster der jeweils zum gleichen Zeitpunkt beprobten Küken deutliche Übereinstimmungen aufwiesen.

Zum Zeitpunkt 0 h zeigte der Blinddarminhalt aller 6 beprobten Hühner eine geringe Diversität im SSCP-Gelprofil mit lediglich einer dominanten Bande (bei allen 6 Proben auf gleicher Höhe zwischen *Mycoplasma sp.* und *Helcococcus sp.* des Speziesstandards). Banden auf dieser Höhe, die aus anderen Proben gewonnen worden waren, stellten sich bei der späteren Sequenzierung als *Acinetobacter*

lwoffii heraus. Bereits 24 h später zeigten sich mehrere Banden im Gel, was für eine gesteigerte Vielfalt der zäkalen Mikrobiota des Darminhalts im Vergleich zum ersten Zeitpunkt der Probennahme spricht. Zudem trat zum Zeitpunkt 24 h eine dominante Bande (auf Höhe von *E. coli* des Speziesstandards) bei allen 6 Proben in Erscheinung (Abbildung 34).

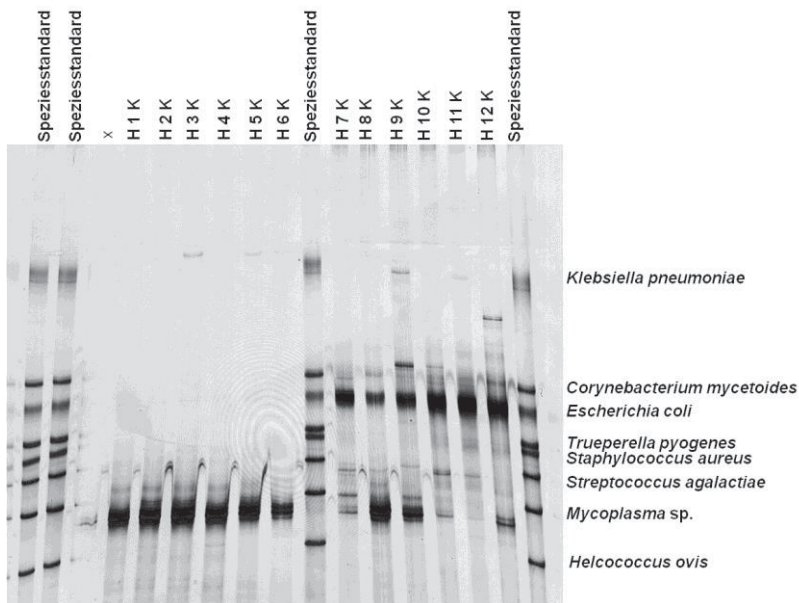


Abbildung 34: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 0 h (H 1 K-H 6 K) und 24 h (H 7 K-H 12 K) der Probennahme

Wie Abbildung 35 zeigt, erschien die Bande auf Höhe von *E. coli* des Speziesstandards auch an Tag 3 (48 h) bei sämtlichen Tieren, nahm aber augenscheinlich etwas an Intensität ab. Neue, weniger dominante Banden traten nun zusätzlich auf. An Tag 7 wiesen alle beprobten Tiere eine deutliche Bande auf einheitlicher Höhe (zwischen der Laufweite von *Klebsiella* sp. und *Corynebacterium* sp.) auf. Diese wurde der Sequenzierung zugeführt und erwies sich bei der Analyse der Sequenzdaten als *Bacteroides* spp. Auch drei weitere sequenzierte Banden stellten sich als *Bacteroides* spp. heraus (Tabelle 19).

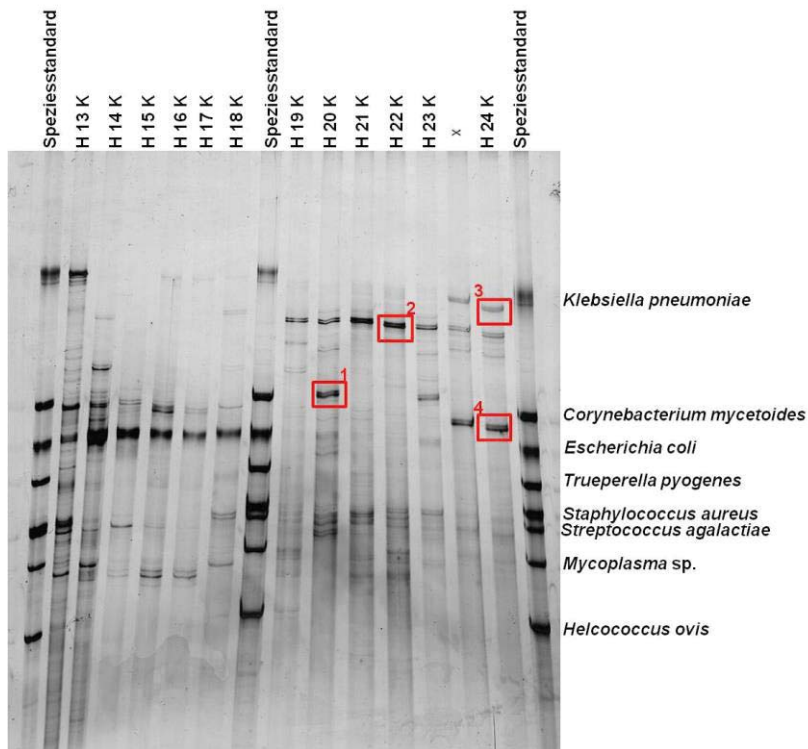


Abbildung 35: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 48 h (H 13 K-H 18 K) und 7 Tage (H 19 K-H 24 K) der Probennahme

Tabelle 19: Zäkales Darmmikrobiom von Tieren aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel

Bandenposition	Übereinstimmung (%) mit	Accession Nr. NCBI
1m	100	<i>Bacteroides ovatus</i> NR_115301.1
2m	100	<i>Bacteroides dorei</i> CP008741.1
	100	<i>Bacteroides fragilis</i> KJ082039.1
3m	100	<i>Bacteroides uniformis</i> JN084205.1
4m	100	<i>Bacteroides uniformis</i> AB908393.1

Am 21. Tag der Mast wurden weitere 6 Hühner desselben Stallabteils beprobt, außerdem erfolgte die Probennahme aus zwei weiteren Ställen, aus diesen wurde ebenfalls Blinddarminhalt von jeweils 6 Tieren untersucht. Die entsprechenden SSCP-Gelprofile können den Abb. im Anhang entnommen werden.

Innerhalb eines Stallabteils ähnelten sich die Bandenmuster augenscheinlich mehr als zwischen unterschiedlichen Stallabteilen. Dies wurde durch die UPGMA-Analyse der PCR-SSCP-Bandenmuster dieser Proben bestätigt (vgl. Punkt

UPGMA-Analyse). Allerdings treten einzelne Banden auch bei Proben aus unterschiedlichen Stallabteilen auf.

Nach 35 Tagen Mastperiode blieb die Diversität in den SSCP-Gelprofilen erhalten. Dabei sind einzelne Banden bei mehreren Tieren zu sehen, es treten jedoch zunehmend individuelle Bandenmuster auf (Abb. im Anhang).

Mukosa-assoziiertes Mikrobiom

Alle 6 Hühner wiesen direkt nach dem Schlupf eine deutliche Bande auf übereinstimmender Position (zwischen den Laufweiten von *Klebsiella* sp. und *Corynebacterium* sp. des Speziesstandards) auf. Diese erschien auch bei den nach 24 h beprobten Tieren, nahm jedoch augenscheinlich an Intensität ab (Abbildung 36). Die Sequenzierung erbrachte aufgrund der Heterogenität der Sequenz kein verwertbares Ergebnis.

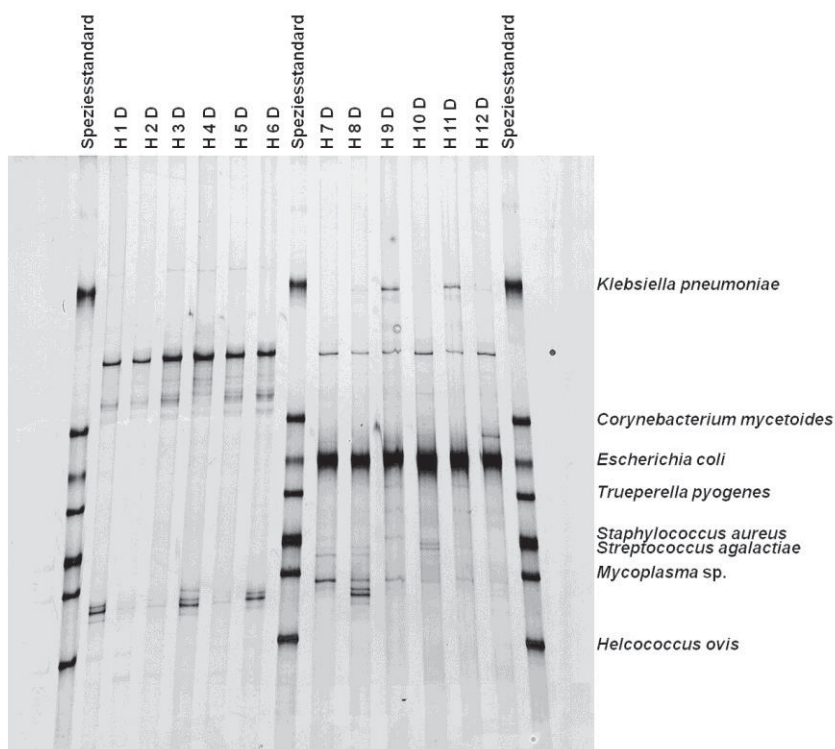


Abbildung 36: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 0 h (H 1 D-H 6 D) und 24 h (H 7 D-H 12 D) der Probennahme

Ab dem Zeitpunkt 24 h kam bei allen 6 Vögeln eine stark ausgeprägte Bande auf Höhe von *E. coli* hinzu. Diese trat auch zum Zeitpunkt 48 h auf, darüber hinaus

kamen nun weitere, klare Banden hinzu und die Diversität im Bandenmuster zeigte sich deutlicher ausgeprägt.

Wie Abbildung 37 zeigt, blieb die Vielfalt im mukosalen Mikrobiom der Küken auch an Tag 7 erhalten. Ausgewählte, dominante Banden zu diesem Probennahmezeitpunkt wurden nun der Sequenzierung zugeführt. So konnte die bei allen sechs Tieren sehr deutlich ausgeprägte Bande auf Höhe von *E. coli* des Speziesstandards tatsächlich als *E. coli* bestätigt werden. Des Weiteren wurden zwei ebenfalls bei allen Tieren zu diesem Zeitpunkt vorhandene Banden sequenziert, ihre Sequenzen konnten *Ruminococcus* und *Bacteroides dorei/fragilis* zugeordnet werden.

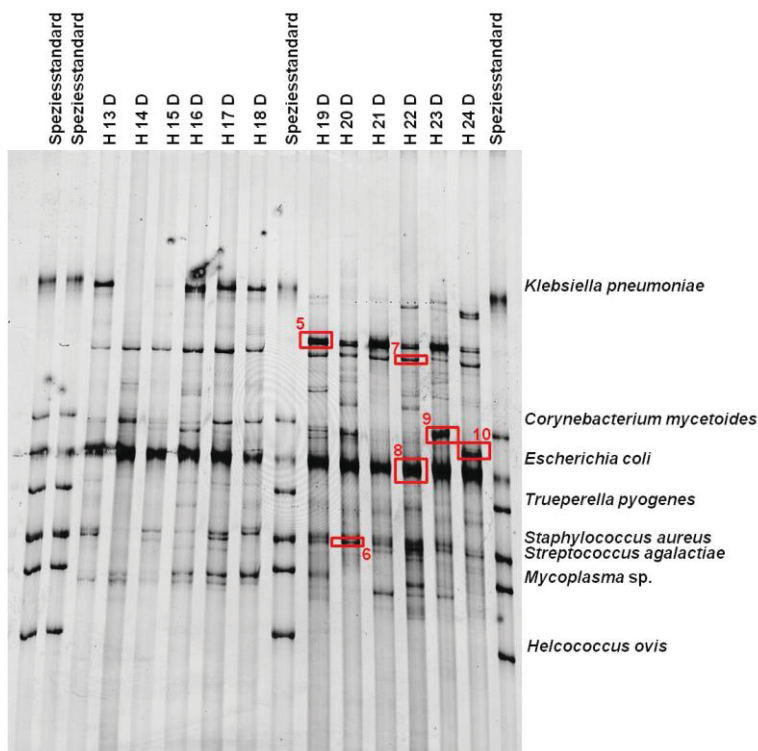


Abbildung 37: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 48 h (H 13 D-H 18 D) und 7 Tage (H 19 D-H 24 D) der Probennahme

Tabelle 20: Mukosa-assoziierte Mikrobiota von Tieren aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel

Banden- position	Übereinstimmung (%) mit	Accession Nr. NCBI
5m= 2m	100	<i>Bacteroides dorei</i> CP008741.1
	100	<i>Bacteroides fragilis</i> KJ082039.1
6m	96	<i>Ruminococcus</i> sp. AJ315979.1
7m	Keine Auswertung möglich	
8m	100	<i>Escherichia</i> sp. DQ629916.1
	99	<i>Escherichia coli</i> KM998074.1
	99	<i>Shigella flexneri</i> LM651928.1
9m= 1m	100	<i>Bacteroides ovatus</i> NR_115301.1
10m= 4m	100	<i>Bacteroides uniformis</i> AB908393.1

An Tag 21 der Mastperiode zeigte sich die Bande auf Höhe von *E. coli* bei 5 Tieren aus demselben Stallabteil deutlich sichtbar, während sie bei einem Huhn nur noch schwach zu erkennen war (Abb. im Anhang).

Zum Zeitpunkt 35 Tage konnte eine ausgeprägte Diversität im Bandenmuster beobachtet werden. Auffällig ist hier eine bei allen 6 Tieren auftretende deutliche Bande auf einer Höhe knapp unterhalb von der Laufweite von *Helcococcus* des Speziesstandards (Abbildung 38), welche in den SSCP-Gelen der früheren Zeitpunkte nicht detektiert werden konnte (Abb. im Anhang). Sie wurde der Sequenzierung zugeführt und konnte *Helicobacter pullorum* zugeordnet werden.

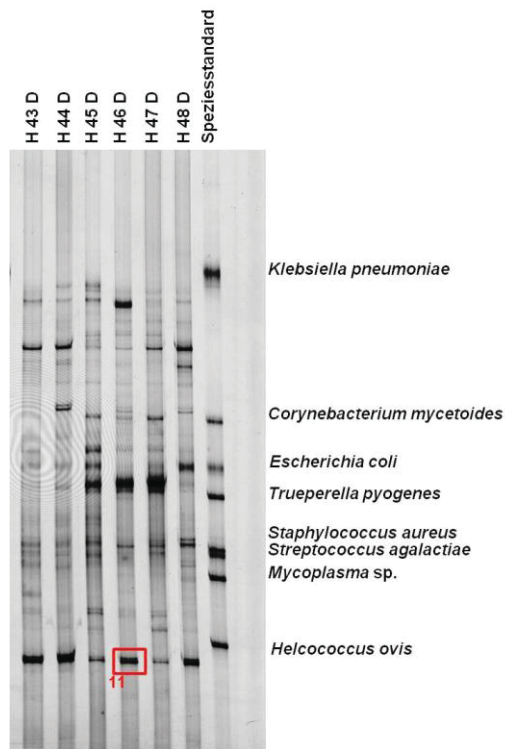


Abbildung 38: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zum den Zeitpunkt 35 Tage (H 43 D-H 48 D)

Tabelle 21: Mukosaproben von Tieren aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 35 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse

Bandenposition	Übereinstimmung %	mit	Accession Nr. NCBI
11 m	99 %	<i>Helicobacter pullorum</i>	KJ534305.1

1.4.5 Vergleich der Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen Tiergruppen mittels UPGMA-Analyse

Zur weiteren Analyse wurden die erstellten SSCP-Gele mit Hilfe der Software GelCompar II ausgewertet. Das Programm kann mit Hilfe des Pearson Korrelationskoeffizients und UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) die Ähnlichkeit der densitometrischen Kurven von Bandenmustern ermitteln und in Cluster einteilen. So war es möglich, die SSCP-Gelprofile der drei untersuchten Tiergruppen – physiologisch inokulierte Küken aus Volierenhaltung, konventionell aufgezogene Hühner aus Maststallhaltung sowie keimarm gehaltene Tiere aus Käfighaltung – zu vergleichen.

Abbildung 39 zeigt die UPGMA-Analyse der Ähnlichkeit (%) der PCR-SSCP-Bandenmuster der am 7. Lebenstag beprobten Tiere.

Der Vergleich der Bandenmuster von PCR-Amplifikaten nach Auftrennung im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel ergab zu diesem Zeitpunkt deutliche Unterschiede zwischen den drei untersuchten Tiergruppen.

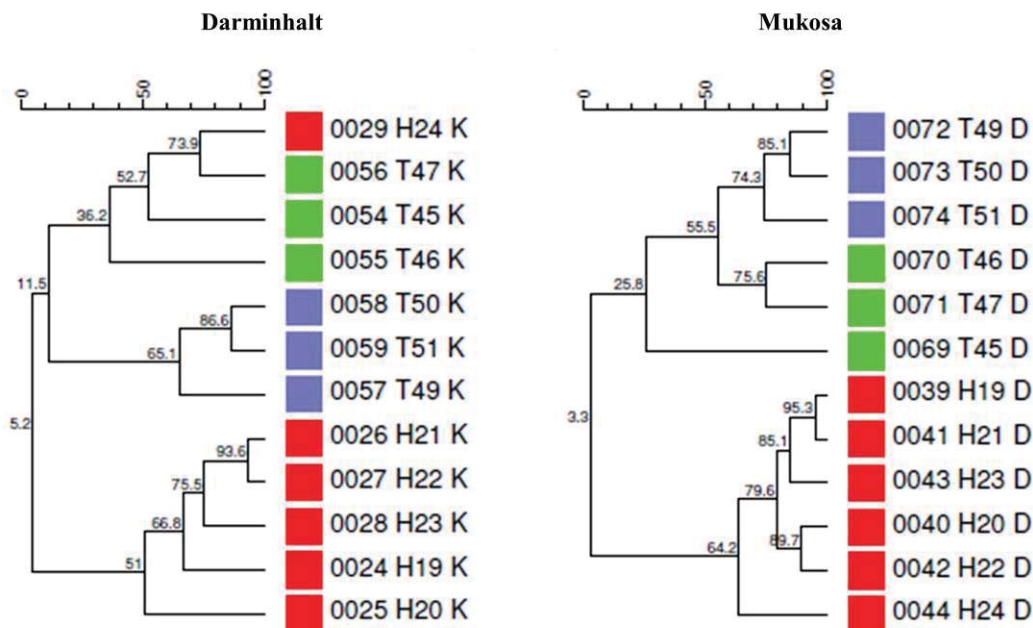


Abbildung 39: UPGMA-Analyse der Ähnlichkeit (%) der PCR-SSCP-Bandenmuster von Küken aus Volierenhaltung (T grün), Küken aus Maststallhaltung (H rot) sowie Küken aus Käfighaltung (T blau) am siebten Lebensstag. K = Proben des Blindarminhalts, D = zäkale Mukosaproben

Zudem wurde die Ähnlichkeit der Bandenmuster in Proben von konventionell innerhalb desselben Stallabteils bzw. in verschiedenen Stallabteilen gehaltenen Hühnern ermittelt. Im Allgemeinen zeigte sich – mit einer Zwischen-Gruppen-Ähnlichkeit von 9,6 bzw. 13,6 % in den Darminhaltsproben – eine geringe Übereinstimmung, während die Ähnlichkeit der Profile innerhalb desselben Stallabteils bis zu 62,3 % betrug. Höhere Übereinstimmung zwischen den Profilen der Tiere aus verschiedenen Stallabteilen wurde für das Mukosa-assoziierte Mikrobiom gefunden (Abbildung 40).

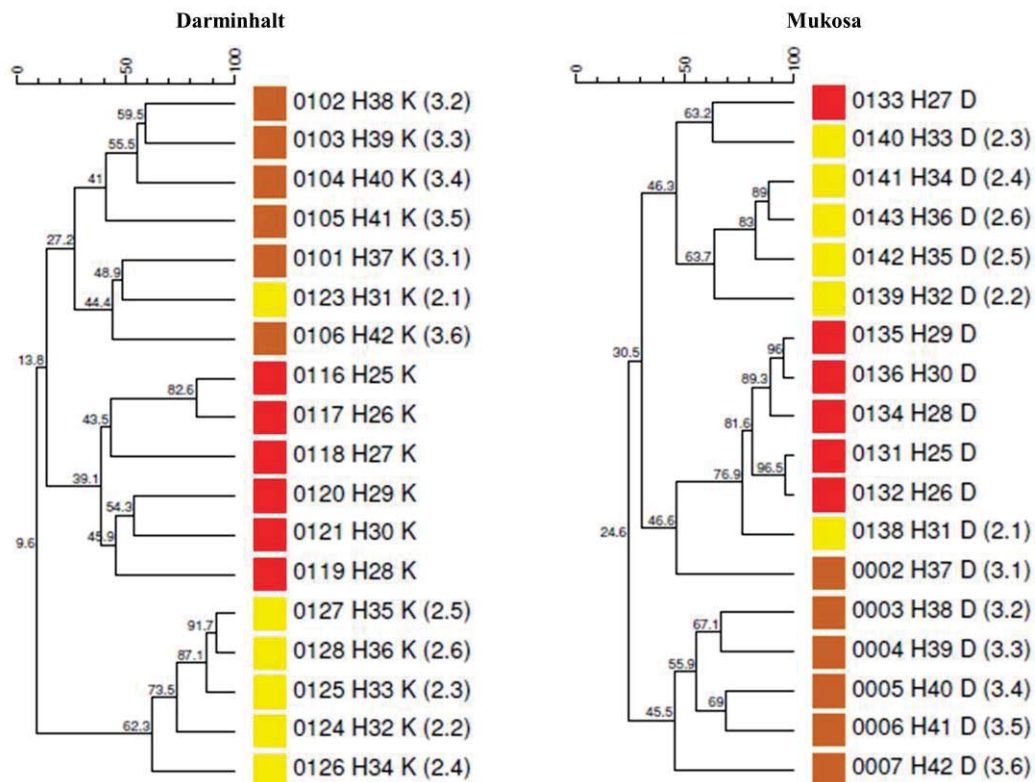


Abbildung 40: UPGMA-Analyse der Ähnlichkeit (%) der PCR-SSCP-Bandenmuster von Tieren aus Maststallhaltung aus den Stallabteilen 1, 2 und 3 an Tag 21 der Probennahme

1.4.6 Wildvögel

Auch die Kloakentupferproben von Schneehühnern wurden mittels SSCP-Methode analysiert. Die Bandenmuster sind in Abbildung 41 und Abbildung 42 dargestellt, die Sequenzierungsergebnisse in Tabelle 22 und Tabelle 23.

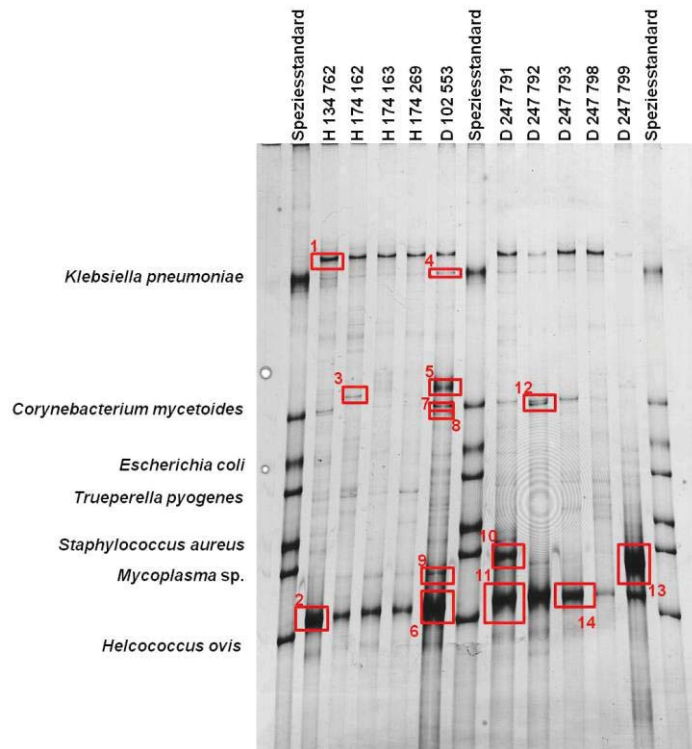


Abbildung 41: SSCP-Analyse des Mikrobioms der Kloake von Schneehühnern (1)

Tabelle 22: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel von Kloakentupferproben von Wildvögeln (1)

Bandenposition	Übereinstimmung (%) mit	Accession Nr. NCBI
1w	100	<i>Curvibacter lanceolatus</i> JQ689182.1
	100	<i>Curvibacter gracilis</i> HM439457.1
2w=6w=11w=1	99	<i>Acinetobacter lwoffii</i> KF993657.1
4w	99	<i>Prolinoborus fasciculus</i> KF843722.1
3w	94	<i>Ralstonia</i> spp. FJ193258.1
4w	100	<i>Bacillus megaterium</i> KJ584614.1
5w	97	Acinomycetaceae KC999377.1
7w=8w=12w	97	<i>Corynebacterium</i> spp HE575908.1
9w=13w	100	<i>Enterococcus lactis</i> KM922591.1
	100	<i>Enterococcus faecium</i> KF879155.1
	100	<i>Enterococcus durans</i> KF879136.1
	100	<i>Enterococcus hirae</i> KM269709.1
	100	<i>Enterococcus mundtii</i> KM005159.1

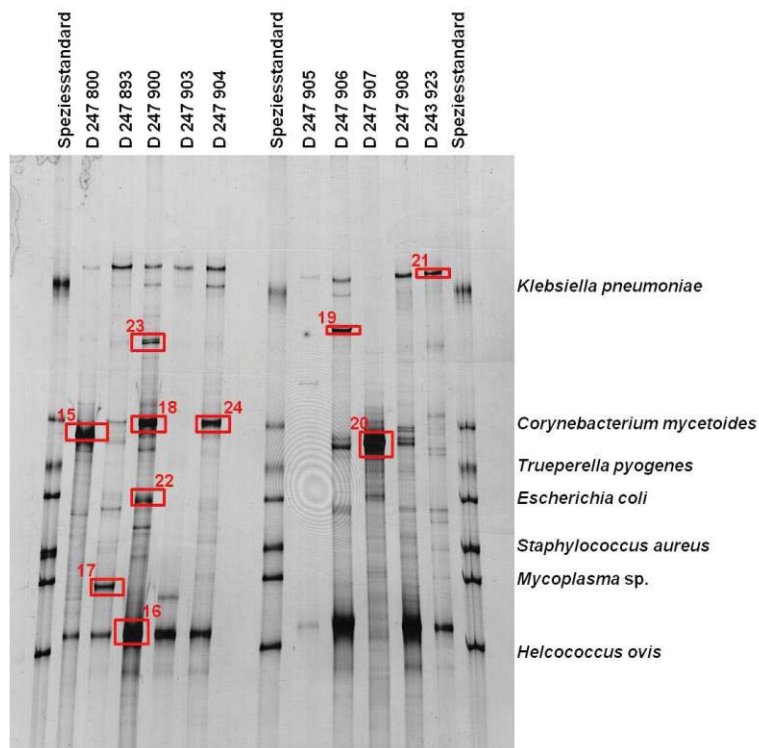


Abbildung 42: SSCP-Analyse des Mikrobioms der Kloake von Schneehühnern (2)

Tabelle 23: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel von Kloakentupferproben von Wildvögeln (2)

Bandenposition	Übereinstimmung (%) mit	Accession Nr. NCBI
16w = 2w	99	<i>Acinetobacter lwoffii</i> KF993657.1
	99	<i>Prolinoborus fasciculus</i> KF843722.1
15w=20w	100	<i>Arthrobacter</i> sp. KF923454.1
17w	100	Oxalobacteraceae JX491461.1
	100	<i>Janinthobacterium</i> sp. GU213389.1
18w=24w	97	<i>Corynebacterium</i> spp. HE575908.1
19w	kein Ergebnis	
21w = 1w	100	<i>Curvibacter lanceolatus</i> JQ689182.1
	100	<i>Curvibacter gracilis</i> HM439457.1
22w	99	<i>Enorma massiliensis</i> NR_125606.1
		Coriobacteriaceae JX424767.1
23w	99	<i>Rhodoturula</i> sp. AB126652.1

2 Auswahl potentieller Inokulumstämme

2.1 Prüfung der phänotypischen Resistenz

Die überprüften *Enterococcus faecium* und *Enterococcus mundtii*-Isolate aus Kloakentupferproben von Schneehühnern zeigten sich frei von erworbener Antibiotikaresistenz, alle MHK-Werte entsprachen der Wildtypverteilung.

2.2 Prüfung von Effekten auf Stoffwechselparameter von Zellen

Um Effekte potentieller Inokulumstämme auf Stoffwechselparameter von Zellen zu beurteilen, wurde der MTT-Assay durchgeführt. Hierbei wurde der IC₅₀-Wert ermittelt, d. h. die Konzentration der Probe, die in Relation zur Kontrolle eine 50 %ige Reduktion der MTT-Spaltungsaktivität bewirkt (Gareis, 2006).

Abbildung 43 und Abbildung 44 zeigen exemplarisch die Beeinflussung eines Stoffwechselparameters von Verozellen durch Kulturüberstände zweier *Ent. mundtii*-Kulturen. Die MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen, welche mit unverdünnten Überständen dieser Keime belastet wurden, lag jeweils über 60 %.

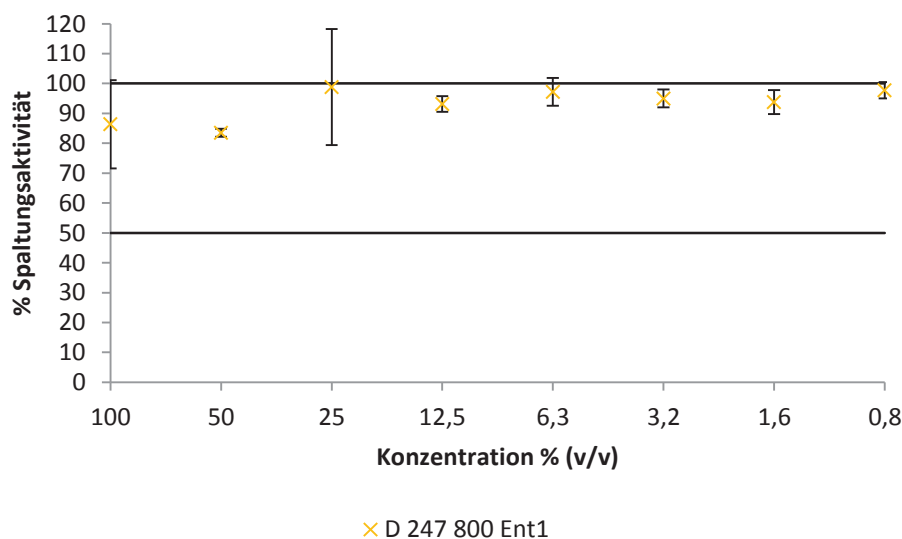


Abbildung 43: Beeinflussung der MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen durch Kulturüberstände des *Ent.mundtii*-Isolates D 247 800 Ent1

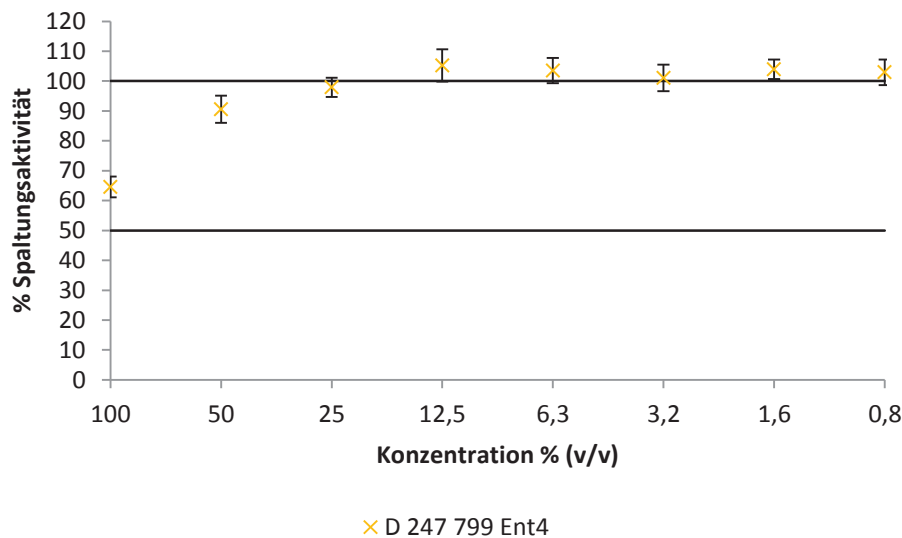


Abbildung 44: Beeinflussung der MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen durch Kulturüberstände des *Ent.mundtii*-Isolates D 247 799 Ent4

Im Rahmen dieses Versuchs wurden 16 *Enterococcus mundtii* sowie 8 *Enterococcus faecium*-Isolate bezüglich ihrer Beeinflussung der MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen evaluiert, die IC₅₀-Werte der Kulturüberstände können Tabelle 24 und Tabelle 25 entnommen werden.

Tabelle 24: IC₅₀-Werte der Kulturüberstände von *Enterococcus mundtii*-Isolaten aus Wildvogelproben (Schneehuhn, Finnland)

Probe	Isolat	IC ₅₀ Überstand (Konzentration in %)
H 174 269	Ent1	> 100
H 174 269	Ent2	> 100
D 102 553	T1	> 100
D 102 553	Ent1	50
D 102 553	Ent2	50
D 247 791	Ent1	> 100
D 247 792	T1	> 100
D 247 792	Ent1	> 100
D 247 793	T1	> 100
D 247 793	Ent1	> 100
D 247 793	Ent2	> 100
D 247 799	Ent3	> 100
D 247 799	Ent4	> 100
D 247 800	T1	> 100
D 247 800	Ent1	> 100
D 247 800	Ent2	> 100

Tabelle 25: IC₅₀-Werte der Kulturüberstände von *Enterococcus faecium*-Isolaten aus Wildvogelproben (Schneehuhn, Finnland)

Probe	Isolat	IC ₅₀ Überstand (Konzentration in %)
H 134 762	Ent1	> 100
H 174 163	Ent1	> 100
D 247 792	Ent2	> 100
D 247 800	Ent3	> 100
D 247 903	T1	> 100
D247 903	Ent 1	> 100
D 247 907	T3	> 100
D 247 907	Ent2	> 100

2.3 Typisierung mittels RAPD-PCR

Acht *Enterococcus faecium* und 16 *Enterococcus mundtii*-Isolate aus Kloakentupferproben vom Wildvogel wurden mittels Amplicon-Typing näher charakterisiert. Die Ergebnisse der RAPD-PCR, die für jedes Isolat in zwei unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt wurde, sind in Abbildung 45 und Abbildung 46 dargestellt.

Bei der Darstellungen der RAPD-PCR Produkte im 1 %igen Agarosegel lassen die 16 evaluierten *Enterococcus mundtii*-Isolate mindestens zwei, die 8 eingesetzten *Enterococcus faecium* Isolate drei klonale Linien vermuten.

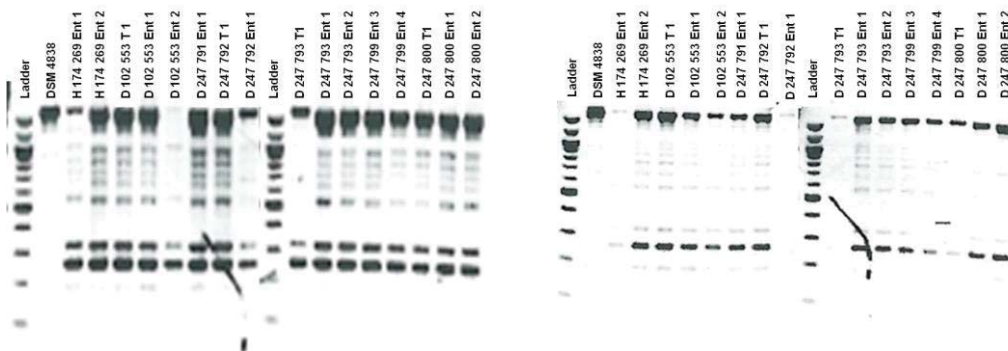


Abbildung 45: RAPD-PCR-Amplikate von *Enterococcus mundtii*-Isolaten aus Kloakentupferproben vom Wildvogel dargestellt durch 1 %iges Agarosegel (links Protokoll 1, rechts Protokoll 2)

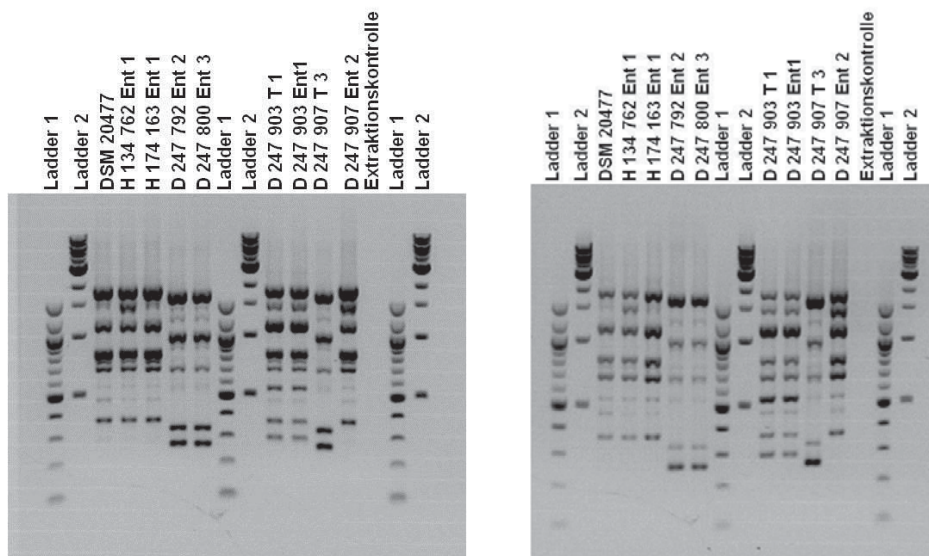


Abbildung 46: RAPD-PCR-Amplifikate von *Enterococcus faecium*-Isolaten aus Kloakentupferproben vom Wildvogel dargestellt durch 1 %iges Agarosegel (links Protokoll 1, rechts Protokoll 2)

2.4 Antimikrobielle Aktivität gegen Pathogene

Bei der Untersuchung auf antimikrobielle Aktivität zeigten 2 der 24 getesteten Enterokokken-Isolate einen leicht hemmenden Effekt auf das Wachstum von *Geobacillus stearothermophilus*, in Form einer 2 mm breiten Inhibitionszone um die mit den bakteriellen Überständen befüllten Bohrlöcher im Nährboden.

Bei den Testkeimen handelte es sich hierbei um zwei Isolate der Spezies *Enterococcus mundtii* (D 247 799 Ent4 und D 247 800 Ent1), die beide gegenüber den weiteren in diesem Test eingesetzten Bakterien keine inhibierende Wirkung aufwiesen. Für alle anderen getesteten Keime konnte keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden.

2.5 Untersuchung auf Keimkonkurrenz-Eigenschaften

Um die Kompetitionsfähigkeit der beiden *Ent. mundtii*-Isolate D 247 799 Ent4 und D 247 800 Ent1 weiter zu evaluieren, wurde ein Keimkonkurrenz-Versuch nach Nichols et al. (1992) (mit Modifikationen) durchgeführt. Hierbei wurden die Wachstumskurven der *Ent. mundtii*-Isolate („Testkeim“) mit den Wachstumskurven unerwünschter Stämme („Indexkeime“) verglichen. Als Indexstämme wurde zum einen ein ESBL-bildender *E. coli*-Stamm (Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. I-K-2-Eco1) mit zusätzlicher Antibiotikaresistenz gegen Spectinomycin, Tobramycin und Cotrimoxazol eingesetzt, zum anderen ein

Salmonella spp.-Isolat (Lehrstuhl für Tierhygiene Nr. II-A3-S-05a). Das Wachstum dieser unerwünschten Keime in Reinkultur wurde zudem verglichen mit ihrem Wachstum in Mischkultur.

2.5.1 Keimkonkurrenz-Versuch 1

2.5.1.1 *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 versus *E. coli*

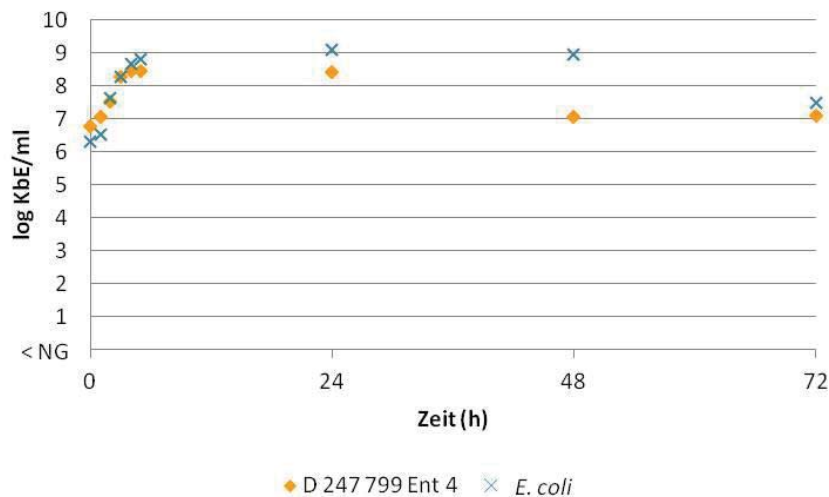


Abbildung 47: Wachstum von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 (Testkeim) und *E. coli* (Indexkeim) in Mischkultur (Inokulum Testkeim + Indexkeim $10^6 + 10^6$ KbE/ml)

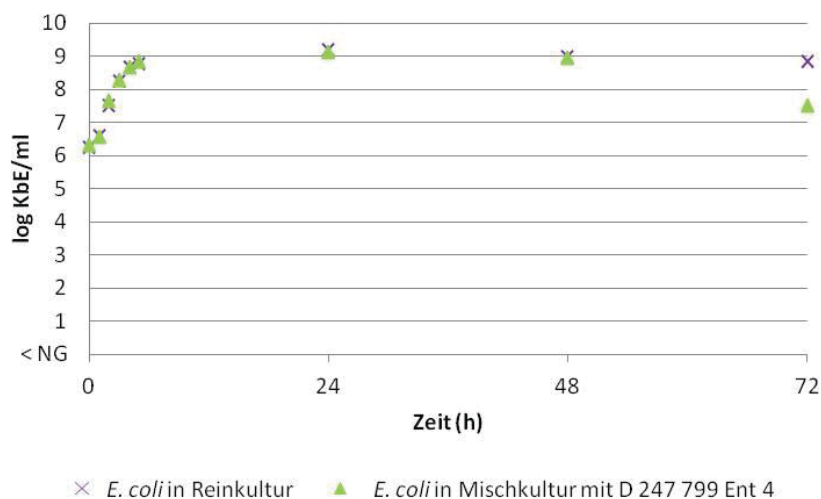


Abbildung 48: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 ($10^6 + 10^6$ KbE/ml)

Der Stamm D 247 799 Ent 4 erreichte in den ersten Stunden der Inokulation und wiederum zum Zeitpunkt 72 h äquivalente Konzentrationen zum konkurrierenden *E. coli*-Stamm (Abbildung 47). Nach 72 h lag die Konzentration des *E. coli* Isolates in Mischkultur mehr als eine Zehnerpotenz unter der Konzentration in Reinkultur (Abbildung 48) dies entsprach einer Reduktion um 99,6 %.

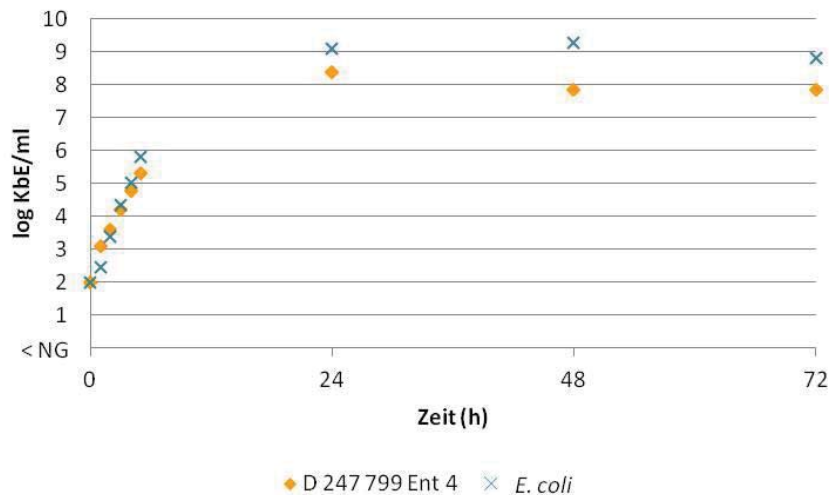


Abbildung 49: Wachstum von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 und *E. coli* in Mischkultur (10^2+10^2 KbE/ml)

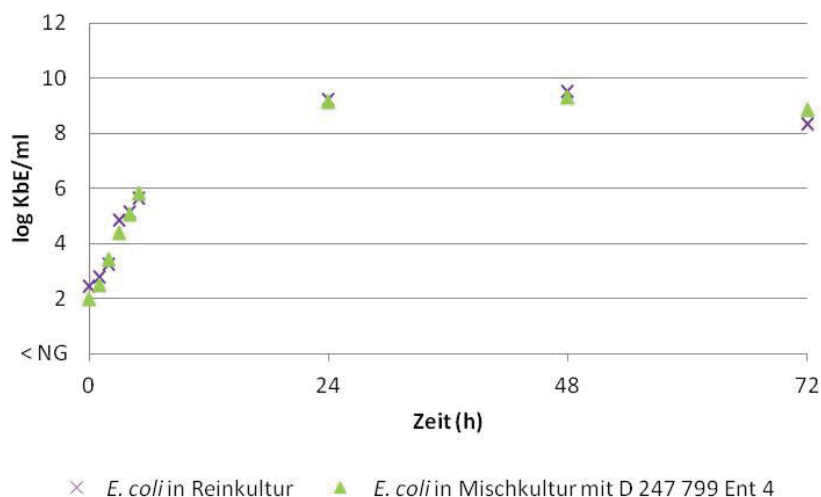


Abbildung 50: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 (10^2+10^2 KbE/ml)

Bei niedrigen Inokulumskonzentrationen (10^2 KbE/ml) zeigte sich der *Enterococcus*-Stamm dem *E. coli*-Isolat ab einem Zeitpunkt von $> 5 < 24$ h in der Konzentration unterlegen, zum Zeitpunkt 72 h um etwa eine Zehnerpotenz

(Abbildung 49) Das Wachstum des *E. coli*-Stammes verlief in Rein- und Mischkultur nahezu identisch (Abbildung 50).

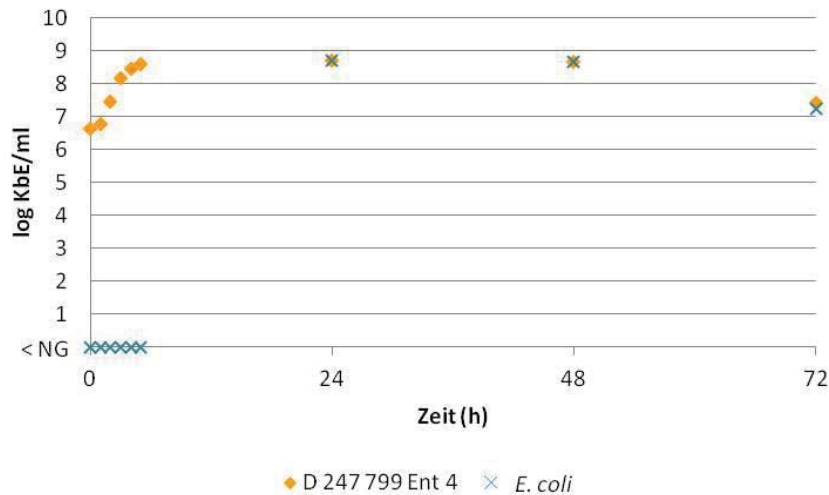


Abbildung 51: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 und *E. coli* in Mischkultur (10^6+10^2 KbE/ml)

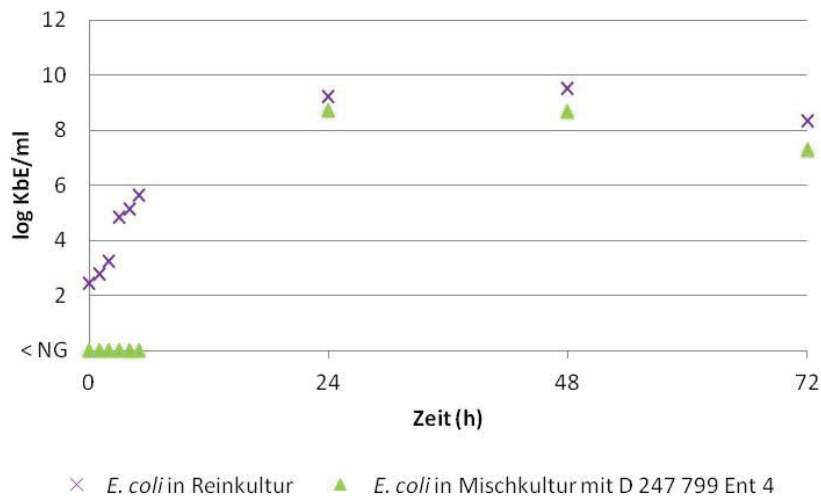


Abbildung 52: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur (10^2 KbE/ml) gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 (10^6+10^2 KbE/ml)

Die Konzentration von *E. coli* lag nach Inokulation von 10^2 KbE in Konkurrenz zu 10^6 KbE des Testkeims bis einschließlich 5 h unter der Nachweisgrenze (Abbildung 51). Nach 24 h zeigte der Keim in Konkurrenz zu *Ent. mundtii* etwas verminderte Konzentrationen, verglichen zur Reinkultur (Abbildung 52).

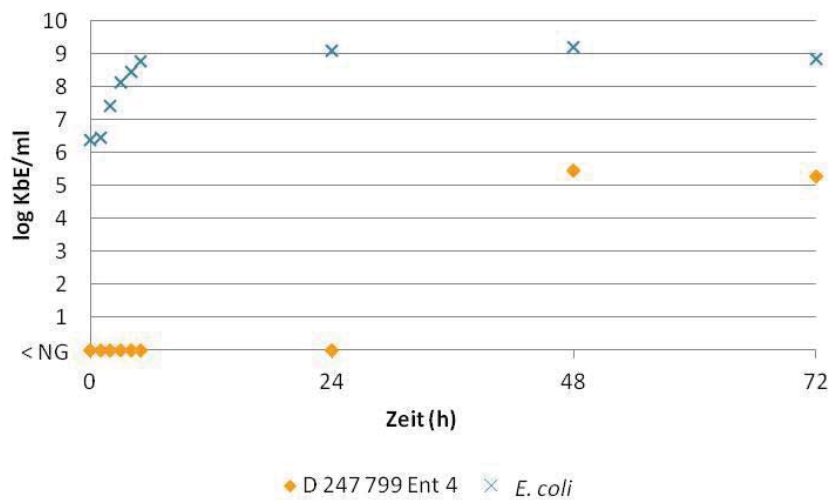


Abbildung 53: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 und *E. coli* in Mischkultur (10²+10⁶ KbE/ml)

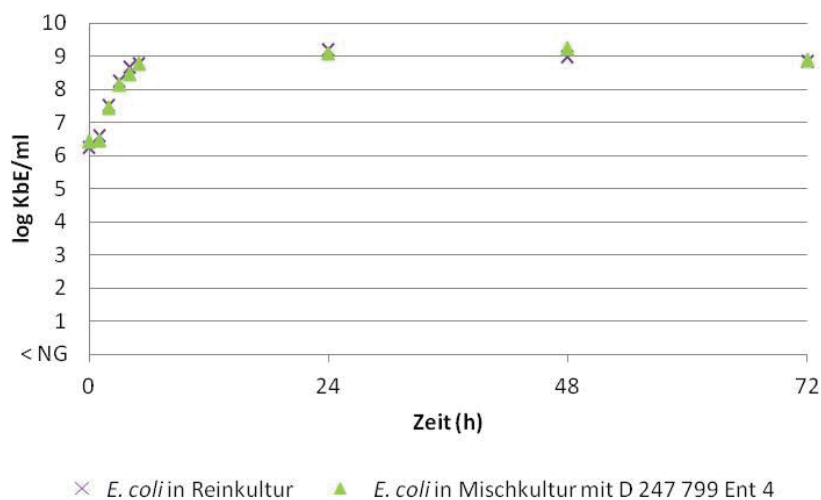


Abbildung 54: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur (10⁶ KbE/ml) gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 (10²+10⁶ KbE/ml)

Bei einem niedrigen Inokulum von 10² KbE/ml war der Testkeim zu hohen Konzentrationen von *E. coli* (10⁶ KbE/ml) nicht konkurrenzfähig, die Konzentration des Testkeims lag auch nach 72 h noch mehr als drei Zehnerpotenzen unter der Konzentration des Indexkeims (Abbildung 53). Die Wachstumskurven des *E. coli*-Isolats spiegeln somit auch ein unbeeinträchtigtes Wachstum in der Mischkultur (Abbildung 54).

2.5.1.2 *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 versus *E. coli*

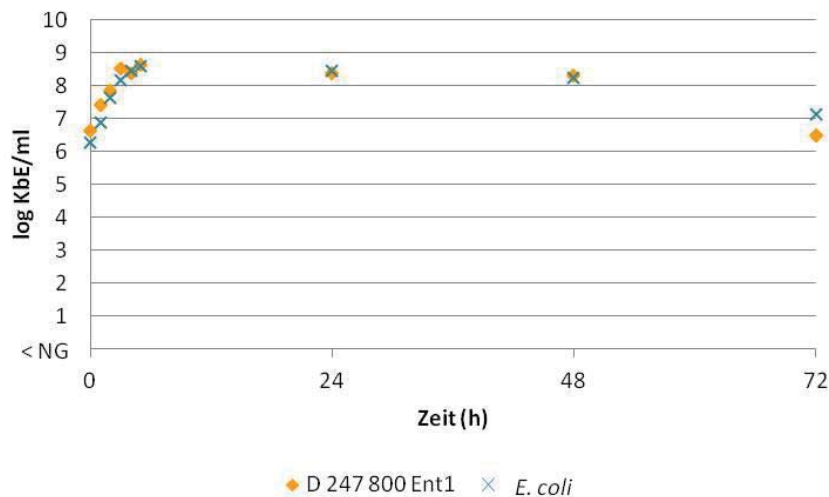


Abbildung 55: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (Testkeim) und *E. coli* (Indexkeim) in Mischkultur (Inokulum Testkeim + Indexkeim 10^6+10^6 KbE/ml)

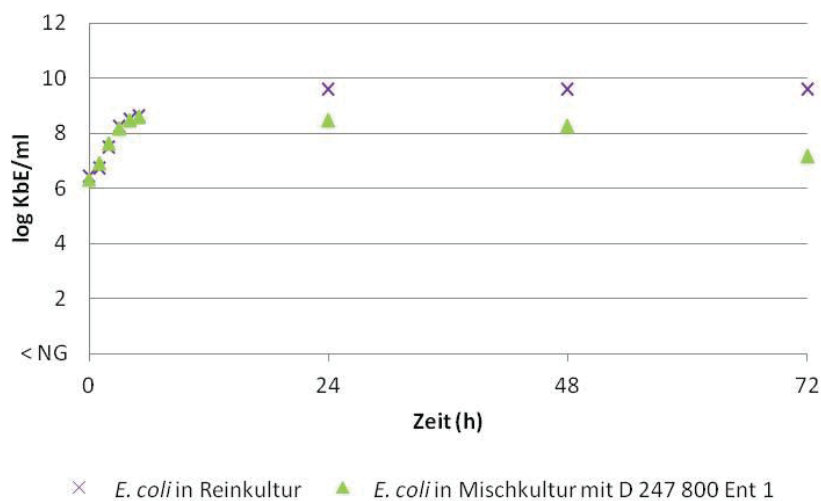


Abbildung 56: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (10^6+10^6 KbE/ml)

Die Wachstumskurven der konkurrierenden Stämme *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 und *E. coli* verlaufen über weite Zeiträume deckungsgleich (Abbildung 55). Ab dem Zeitpunkt 24 h erreichte der Indexkeim in Reinkultur deutlich höhere Konzentrationen als in Mischkultur mit dem Testkeim (Abbildung 56).

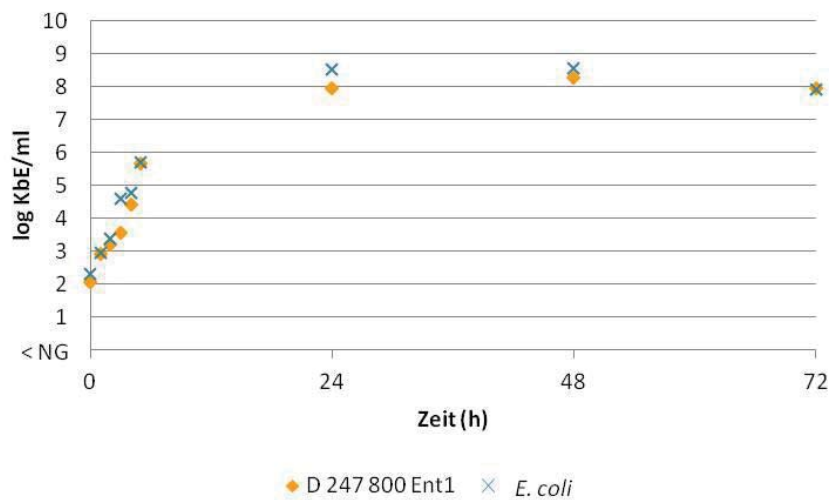


Abbildung 57: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 und *E. coli* in Mischkultur (10^2+10^2 KbE/ml)

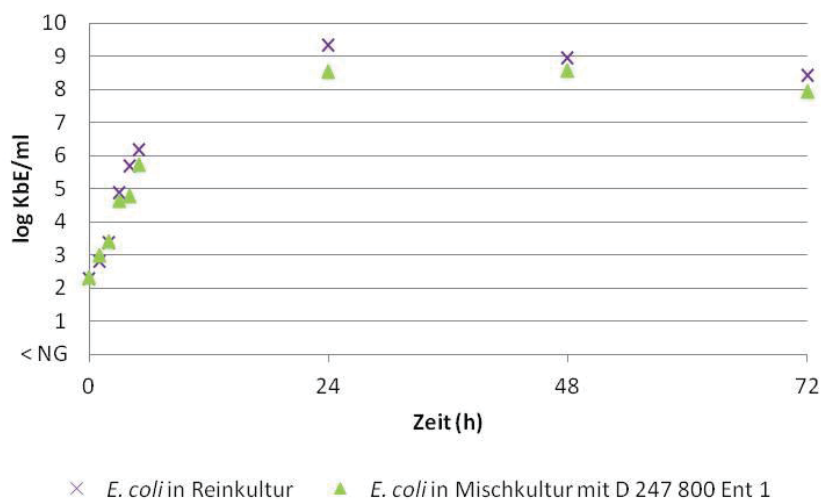


Abbildung 58: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (10^2+10^2 KbE/ml)

Auch bei einem niedrigen Inokulum bleibt der Testkeim gegenüber einer ähnlich geringen Konzentration des Indikatorkeims konkurrenzfähig (Abbildung 57). Der Verlauf beider Kurven zeigt nur geringgradig verminderte Konzentrationen des *E. coli*-Isolates in Mischkultur, verglichen zur Reinkultur an (Abbildung 58).

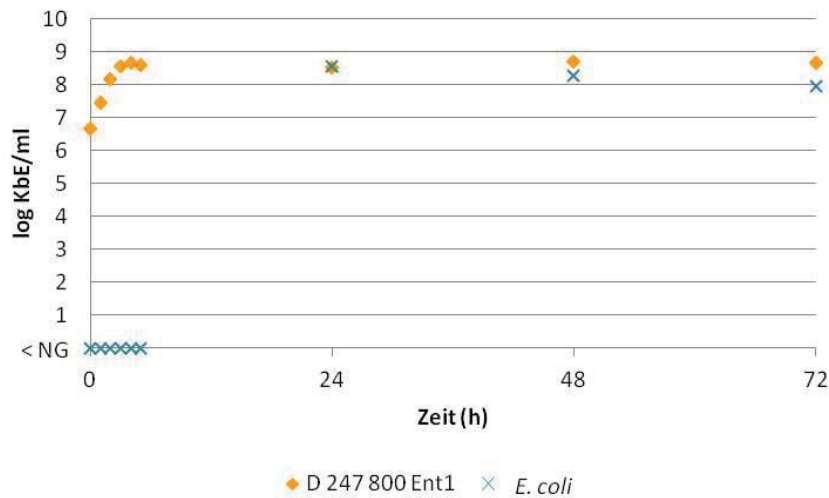


Abbildung 59: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 und *E. coli* in Mischkultur (10⁶+10² KbE/ml)

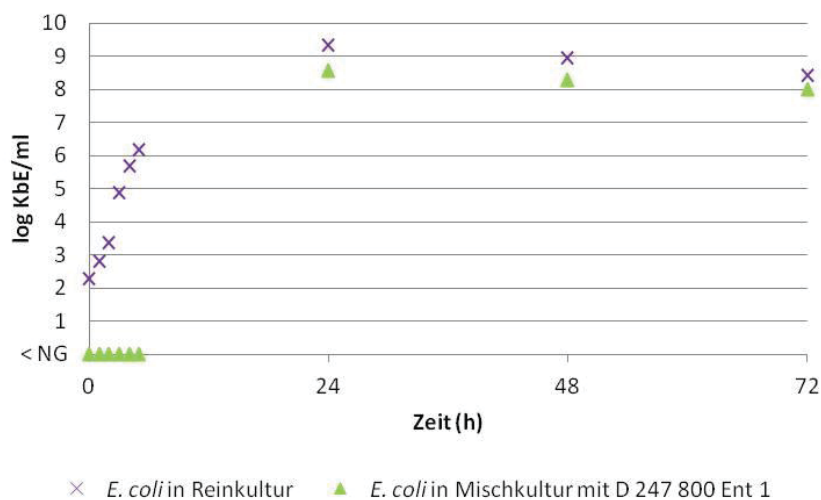


Abbildung 60: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (10⁶+10² KbE/ml)

Bei niedrigem Inokulum des Indexkeims bleibt dessen Konzentration in Gegenwart hoher Konzentrationen des Testkeims bis zum Zeitpunkt $> 5 < 24$ h unter der Nachweisgrenze (Abbildung 59). Ab 24 h zeigt der Indexkeim in Mischkultur wiederum ein geringgradig vermindertes Wachstum, verglichen zur Reinkultur (Abbildung 60).

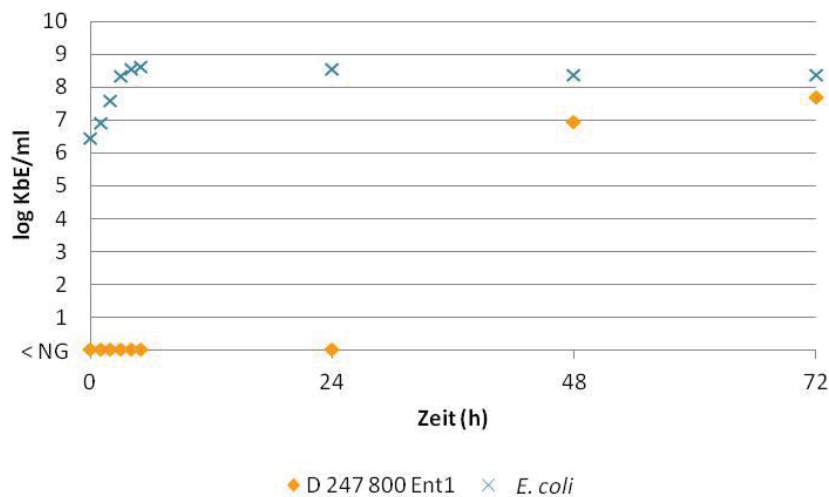


Abbildung 61: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 und *E. coli* in Mischkultur (10^2+10^6 KbE/ml)

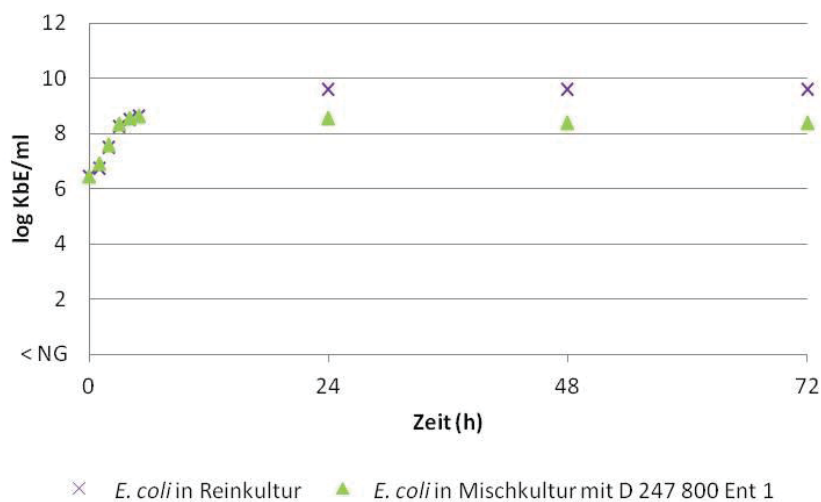


Abbildung 62: Wachstum des *E. coli*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (10^2+10^6 KbE/ml)

Der Testkeim erreicht in Mischkultur mit *E. coli* erst nach über 24 h die Nachweisgrenze (Abbildung 61). In der Konkurrenzsituation zu *Ent. mundtii* ist die Konzentration des *E. coli*-Isolates dennoch ab dem Zeitpunkt 24 h um mehr als eine Zehnerpotenz verringert, verglichen zur Reinkultur (Abbildung 62).

2.5.1.3 *Ent. mundtii* vs. *Salmonella* spp.

Die *Enterococcus*-Isolate erscheinen grundsätzlich kompetitionsfähig zum *Salmonella*-Isolat, jedoch zeigte sich das *Salmonella*-Isolat in Mischkultur verglichen zur Reinkultur nur in vier der acht Ansätze inhibiert, maximal um 85,7 %. Wachstumskurven zu den entsprechenden Keimkonkurrenzexperimenten sind im Anhang dargestellt.

2.5.2 Keimkonkurrenz-Versuch 2

In einem weiteren Versuch wurde die Kompetitionsfähigkeit eines potentiellen Inokulum-Stammes gegenüber *E. coli*-Isolaten ($n = 34$) untersucht. Die eingesetzten *E. coli*-Isolate stammten aus Zäkumproben von Eintagsküken aus Maststallhaltung und wurden zuvor auf ihre phänotypische Antibiotikaresistenz getestet (siehe Punkt IV1.3.1.3). Sämtliche Isolate wurden jeweils sowohl in Rein- als auch in Mischkultur mit dem *Enterococcus mundtii*-Isolat D 247 800 Ent1 (aus Kloakentupferproben vom Schneehuhn) angezüchtet. Nach 72 h Bebrütungszeit wurde das Wachstum der *E. coli*-Isolate in Reinkultur mit ihrem Wachstum in Mischkultur mit *Enterococcus mundtii* D 247 800 Ent1 verglichen, um dessen inhibitorische Einflüsse auf die eingesetzten *E. coli*-Stämme zu überprüfen. Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon Signed Rank Test. Dabei ergab sich ein Z-Wert von -1.4026, der p-Wert lag bei 0,16152. Somit waren keine signifikanten Unterschiede des Wachstums der *E. coli*-Isolate in Rein- und Mischkultur nachweisbar. Das Ergebnis dieses Keimkonkurrenz-Versuchs ist in Abbildung 63 dargestellt.

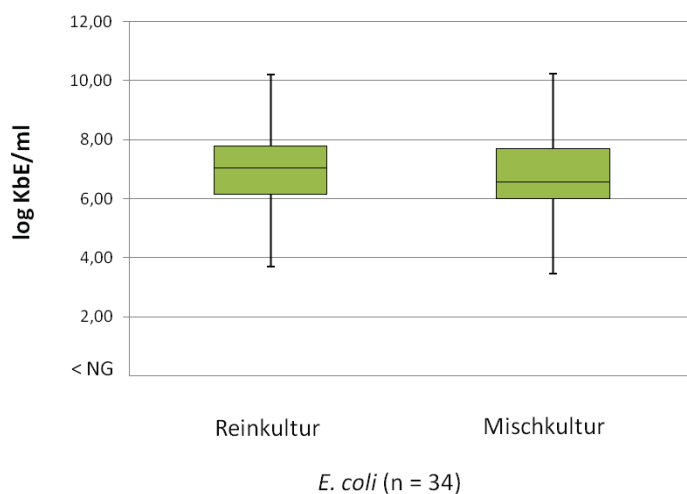


Abbildung 63: Wachstum von *E. coli*-Isolaten ($n = 34$) von Küken aus Maststallhaltung (≤ 24 h) in Reinkultur gegenüber ihrem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 ($10^6 + 10^6$ KbE/ml)

V DISKUSSION

1 Untersuchungsmaterial

Um die Heranbildung des intestinalen Mikrobioms von Küken nachzuvollziehen wurden Darminhalt und Mukosa ihrer Zäka mikrobiologisch untersucht. Der Blinddarm zeigt beim Huhn in der Regel die größte Diversität der intestinalen Mikrobiota, zudem werden in diesem Segment die höchsten Keimzahlen erreicht (Gerlach, 1994; Lu *et al.*, 2003; van der Wielen *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2006). So hat die physiologische Besiedlung des Zäkums beim Vogel erheblichen Einfluss auf Gesundheit und Leistung der Tiere (Clench & Mathias, 1995; Stanley *et al.*, 2014).

Um die anhand klassischer Kultivierungsmethoden ermittelten Keimzahlen untereinander vergleichbar zu machen wurde – für jede beprobte Altersstufe der Küken – durch Messung des Innendurchmessers und der Länge des untersuchten Darmstückes dessen Volumen und Fläche bestimmt. Im Anschluss wurden sämtliche Keimzahlen auf 1 cm^3 Darmvolumen (für das Mikrobiom des Darminhalts) bzw. 1 cm^2 Darmgrundfläche (für das Mukosa-assoziierte Mikrobiom) bezogen. Die Zahl der Mukosa-assoziierten Mikroorganismen bezieht sich folglich auf 1 cm^2 Grundfläche der zäkalen Schleimhaut. Hierbei nicht berücksichtigt ist die Oberflächenvergrößerung der Darmschleimhaut in Folge der Ausbildung von Darmzotten, welche beim Geflügel in allen Darmabschnitten auftreten (König *et al.*, 2009).

In einem weiteren Versuch wurden Kloakentupferproben von Schneehühnern (Finnland) analysiert: diese wurden mit sterilen Tupfern entnommen, unverzüglich in Transportmedium verbracht und gekühlt an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit gesendet. Dennoch kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass Keime von der Oberfläche des Tierkörpers an die Tupfer gelangt sind. Zudem birgt der lange Transportweg die Gefahr, dass eine Temperatur von 4 °C nicht dauerhaft gewährleistet ist und Nährstoffe im Transportmedium bis zur bakteriologischen Untersuchung der Proben aufgebraucht sind. Dadurch kann sich ein verzerrtes Bild des Keimspektrums der Tupferproben ergeben.

Zunächst war beabsichtigt, anhand von Darm(-inhalts)proben von Schneehühnern aus ihrem natürlichen Habitat Aufschluss über die physiologische Zusammensetzung des „naturbelassenen“ und vom Menschen weitgehend unbeeinflussten intestinalen Mikrobioms von Schneehühnern zu gewinnen. Aus organisatorischen Gründen auf Seiten der finnischen Projektpartner konnten diese Proben jedoch nicht zur Verfügung gestellt werden. Ein Förderantrag für Reisemittel, der die Probennahme und -bearbeitung durch deutsche Mitarbeiter vor Ort ermöglichen sollte, wurde negativ beschieden. Daher wurden für grob orientierende Untersuchungen die zur Verfügung stehenden Kloakentupferproben genutzt. Dabei muss beachtet werden, dass der mikrobielle Inhalt der Kloake davon abhängt, ob sich in diesem Abschnitt zum Probennahmezeitpunkt Material aus dem Dünndarm oder den sich 2 bis 4 mal täglich entleerenden Blinddärmen befindet (Barrow, 1992); außerdem können anhand von Tupferproben keine Aussagen über die quantitative Zusammensetzung der Darmflora getroffen werden und auch die Mukosa-assoziierten Mikroorganismen bleiben hierbei unberücksichtigt.

Der ursprünglichen Intention nach stellten die Kloakentupferproben eine mögliche Quelle zur Gewinnung potentiell protektiver Vertreter aus den physiologischen Darmmikrobiota von Schneehühnern dar. Diese Mikroorganismen sollten im Anschluss näher charakterisiert und ihre inhibitorischen Effekte als Mono-Spezies gegenüber pathogenen / resistenten Keimen *in vitro* erfasst werden um ihre Eignung als potentielle Inokulumstämme im Sinne einer „competitive exclusion“ zu überprüfen. Ziel ist es, hochempfindliche Eintagsküken durch die Verabreichung ausgewählter Bakterien vor einer Besiedelung ihres Gastrointestinaltrakts durch (potentielle) Pathogene zu schützen.

Aufgrund der weiten Verbreitung von Antibiotikaresistenzen – etwa auch bei ökologisch gehaltenen Legehennen (Schwaiger et al., 2012) – erscheinen Wildtiere hierfür als möglicherweise geeignete Quelle. Da antibiotikaresistente Keime auch in Proben von Wildvögeln detektiert werden konnten, die diese beispielsweise über menschliche Abfallprodukte, Abwässer oder Kontakt zu Intensivtierhaltungen erwerben und so auch ein Reservoir für Antibiotikaresistenzgene darstellen können (Bonnedahl & Jarhult, 2014), erscheint es sinnvoll, potentielle Inokulumstämme aus Wildvögeln zu isolieren, deren Lebensraum Gebiete geringerer Bevölkerungsdichte darstellt.

Aufgrund wirtsspezifischer Wechselwirkungen ist es für die Ansiedelung eines Bakteriums im Intestinaltrakt des Wirtsorganismus von erheblicher Bedeutung, ob es sich dabei um einen „autochthonen“ Stamm handelt, welcher aus derselben Wirtsspezies isoliert wurde (Fuller, 1974). Es konnte gezeigt werden, dass Küken auch durch die Verabreichung der Darmmikrobiota bestimmter anderer Vogelarten vor einer intestinalen Kolonisation von pathogenen Mikroorganismen geschützt werden (Weinack *et al.*, 1982; Impey *et al.*, 1984), die Mikrobiota anderer Tierarten (z. B. von Pferden oder Rindern) entfalten jedoch keine protektive Wirkung (Nurmi & Rantala, 1973).

2 Einordnung der Ergebnisse mikrobiologisch-kultureller Untersuchungen

2.1 Quantitative und qualitative mikrobiologisch-kulturelle Untersuchungen

Anhand der klassischen Kultivierung von Bakterien auf nicht-selektiven wie selektiven Nährmedien wurde die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota von Küken, welche ab dem Zeitpunkt des Schlupfes unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt waren, zunächst quantitativ erfasst. Zur weiteren Differenzierung der isolierten Mikroorganismen erfolgten Untersuchungen mit Hilfe biochemischer Tests und MALDI-TOF-MS Analytik. Ziel war es, Aussagen über die qualitative Zusammensetzung der Darmflora von Küken aus unterschiedlichen Haltungsformen – „natürlich“ inokulierte Jungtiere aus Volierenhaltung, keimarm gehaltene Küken aus Käfighaltung sowie unter konventionellen Mastbedingungen aufgezogene Tiere – zu treffen. Dabei sollten sowohl die im Lumen befindlichen, als auch die stark Mukosa-angehafteten Bakterien (nach Gong *et al.*, 2002) erfasst werden.

Die klassische bakteriologische Untersuchung bietet dabei eine Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der Gesamtkeimzahl und kann einen Überblick über das bakterielle Keimspektrum im Probenmaterial geben; außerdem ist es möglich an vitalen Bakterien die phänotypische Antibiotikaresistenz zu bestimmen. Darüber hinaus ist es insbesondere für die Auswahl potentieller Inokulumstämme entscheidend, lebende und anzüchtbare Mikroorganismen – hier aus Kloakentupferproben vom Schneehuhn (Finnland) – zu gewinnen (Rantala, 1974; Snoeyenbos *et al.*, 1978).

Da nach derzeitigem Stand nur ca. 20–50 % der Darmbakterien kultivierbar sind (Zoetendal *et al.*, 1998; Zoetendal & Mackie, 2005), ist es zum einen unerlässlich, eine sorgfältige Auswahl der verwendeten Nährmedien zu treffen (Wintzingerode *et al.*, 1997); zum anderen stellen molekularbiologische Untersuchungen ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung des intestinalen Mikrobioms dar, da auf diese Weise auch ein Großteil der nicht kultivierbaren Keime erfasst werden kann (Higuchi *et al.*, 1992; Gong *et al.*, 2002).

Nach Isolierung der anzüchtbaren Mikroorganismen wurden diese zu ihrer näheren Identifizierung verschiedenen biochemischen Tests unterzogen, zudem erfolgte die weitere Analyse von Keimen mittels MALDI-TOF-MS-Technik. Anhand dieser massenspektrometrischen Methode lassen sich Bakterien zuverlässig, schnell, objektiv sowie kostengünstig bestimmen (Seng *et al.*, 2009; Carbonnelle *et al.*, 2011; Welker, 2012). Gegenüber biochemischen Differenzierungssystemen (z. B. API® 50 CH) wird den durch MALDI-TOF-MS-Analyse gelieferten Ergebnissen eine höhere Genauigkeit und bessere Reproduzierbarkeit zugesprochen (Burak & Gehrt, 2010; Albert *et al.*, 2011; Wieser *et al.*, 2012). Mit dieser Methode werden vornehmlich hochkonservierte ribosomale Proteine detektiert, somit ist sie unabhängiger von Stoffwechseleigenschaften der Keime (Wieser *et al.*, 2012). Die MALDI-TOF-MS-Technik ist jedoch häufig nicht in der Lage sehr nah verwandte Mikroorganismen zu unterscheiden; außerdem ist für Identifizierungsraten und Zuverlässigkeit des MALDI-TOF-MS-Systems das Vorhandensein einer validen Referenz-Datenbank entscheidend (Wieser *et al.*, 2012; Welker & Moore, 2011); diese kann jederzeit um neue Protein-Referenzspektren erweitert werden. Des Weiteren sollten Keimanzüchtung und Probenvorbereitung nach einem standardisierten Verfahren erfolgen, um die Reproduzierbarkeit der Resultate zu gewährleisten und die Ergebnisse besser vergleichbar zu machen (Freiwald & Sauer, 2009; Fenselau & Demirev, 2001; Carbonnelle *et al.*, 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand bakterieller Kultivierungsmethoden gezeigt, dass Küken, die unmittelbar nach dem Schlupf aus ungewaschenen Bruteiern Kontakt zu Althennenkot hatten, in ihrer ersten Lebenswoche eine vielfältige Darmflora entwickelten. Unter natürlichen Bedingungen nimmt das Küken beim Aufpicken der Eischale während des Schlupfes zunächst Bakterien von der Eioberfläche auf. Die frisch geschlüpften

Küken haben anschließend Kontakt zu Mikroorganismen aus der Umgebung des Nests und leben während ihren ersten Lebenswochen in engem Kontakt zur Glucke wodurch sich eine physiologische Kolonisierung des juvenilen Gastrointestinaltraktes mit Mikroorganismen aus dem maternalen Mikrobiom vollzieht (Smith, 1965; Fuller, 1984; Stanley, 2013). In Folge dessen stammen die erstbesiedelnden Keime aus dem autochthonen Mikrobiom gesunder, adulter Artgenossen. Sie tragen nun zum Schutz des hochempfänglichen Kükens vor (potentiell) pathogenen Keimen bei, denn parallel zur Heranbildung eines stabilen physiologischen Darm-Mikrobioms entwickelt das Jungtier eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber *Salmonella*-Serovaren und anderen (potentiell) pathogenen Keimen (Nurmi & Rantalla, 1973; Barnes *et al.*, 1980; Soerjadi-Liem *et al.*, 1984b; Hakkinen & Schneitz, 1996, 1999; Craven *et al.*, 1999; Hofacre *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu den physiologisch inokulierten Küken aus Volierenhaltung fiel die zäkale Besiedlung durch Mikroorganismen bei den keimarm gehaltenen Käfigtieren im durchgeführten Versuch fast immer gering aus. Der fehlende Kontakt der Küken zu den Elterntieren und die Haltung der Tiere in gereinigten und desinfizierten Ställen verzögert den Prozess der Darmfloraentwicklung; stattdessen stammen die ersten Mikroorganismen, mit denen diese Tiere konfrontiert werden von Futter, Wasser, Einstreu, Transportboxen und Personal (Fuller, 1984), wodurch auch die Ansiedelung von (potentiell) pathogenen Keimen gefördert wird (Nurmi & Rantalla, 1973; Crhanova *et al.*, 2011).

Fryklund *et al.* beschrieben 1992 vergleichbare Verhältnisse für Babys, die in Krankenhäusern entbunden wurden und bei denen teilweise eine stark von Keimen aus dem Krankenhausmilieu geprägte fäkalen Flora nachgewiesen wurde (Fryklund *et al.*, 1992). Aus mikroökologischer Sicht ist diese frühkindliche Besiedlung mit Hospitalkeimen unerwünscht, da solche Stämme oftmals Träger von multiplen Antibiotika-Resistenzen oder Virulenzmerkmalen sind (Schulze *et al.*, 2008). Auch Babys, die per Kaiserschnitt entbunden wurden, besaßen anders zusammengesetzte Mikrobiota als Neugeborene, die auf natürlichem Wege zur Welt kamen (Dominguez-Bello, 2010), dieser Unterschied scheint sich längerfristig auf die bakteriellen Zusammensetzung im Darmtrakt auszuwirken und konnte noch ein halbes Jahr später nachgewiesen werden (Grönlund *et al.*, 1999).

Auch in modernen Brütereien herrschen hohe Hygienestandards, um potentielle Krankheitserreger auszuschließen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beprobten Tiere, welche unter konventionellen Bedingungen im Maststall aufgezogen wurden, zeigten im Vergleich zu den physiologisch inokulierten Hühnern aus Volierenhaltung eine verzögerte Besiedlung des Zäkums durch Laktobazillen: Während diese Bakteriengattung bei den Volierentieren bereits innerhalb der ersten 24 h aus Darminhalt und zäkaler Mukosa isoliert werden konnten, erfolgte der Nachweis von Laktobazillen bei den konventionell aufgezogenen Hühnern erst nach 48 h. Bei der Tiergruppe aus Maststallhaltung erreichten *Lactobacillus* spp. ab Tag 7 der Probennahme Keimzahlen um 10^7 bis 10^8 KbE pro cm^3 Darm, während bei physiologisch inokulierten Volierentiere bereits nach 24 h entsprechende Werte für den Darminhalt nachgewiesen werden konnten.

Bei Mikroorganismen der Gattung *Lactobacillus* handelt es sich um grampositive, anaerobe oder fakultativ anaerobe stäbchenförmigen Bakterien, die keine Befähigung zur Sporenbildung haben und vornehmlich apathogen sind (Selbitz *et al.*, 2010). Sie bauen Zucker fermentativ zu Milchsäure ab und tragen so zu einer Senkung des pH-Werts ihres umgebenden Milieus (z. B. im Gastrointestinaltrakt) bei, auf diese Weise wird das Wachstum von *E. coli* und anderen säureempfindlichen Keimen gehemmt (Fuller, 1964). Zudem erhöht Lactat die Permeabilität der äußeren Zellmembran gramnegativer Keime, sodass die Wirksamkeit der durch manche *Lactobacillus*-Stämme produzierten antimikrobiellen Substanzen (z. B. Bakteriozine, Reuterin) gesteigert wird (Alakomi, 2000). Aufgrund dieser Mechanismen können *Lactobacillus* spp. antagonistisch gegen unerwünschte Keime wirken (Klein *et al.*, 1998; Ouwehand & Vesterlund, 2004). Sie finden daher auch häufigen Einsatz als Probiotika (Schulze *et al.*, 2008).

Bare und Wisemann (1964) zeigten, dass die Kolonisation des Darmes von Küken mit Laktobazillen verzögert wird, wenn die Tiere in einer „sauberen“ Umgebung schlüpfen in der sich zuvor keine Artgenossen aufhielten (Bare & Wiseman, 1964). Andererseits kann die Ansiedlung von Laktobazillen im Magen-Darmtrakt beschleunigt werden, wenn diese frisch geschlüpften Küken verabreicht werden (Fuller, 1973).

Zum Nachweis von Laktobazillen wurde für die vorliegende Studie der hochselektive LAMVAB-Agar nach Hartemink et al. (1997) ausgewählt. Dieses Medium inhibiert durch seinen niedrigen pH-Wert und den Zusatz von Vancomycin das Wachstum zahlreicher Mikroorganismen, hingegen handelt es sich bei Laktobazillen um säuretolerante Bakterien, die zumeist auch eine intrinsische Resistenz gegen Vancomycin aufweisen (Hartemink *et al.*, 1997). Dabei muss jedoch bedacht werden, dass Vancomycin-sensible *Lactobacillus* spp., wie z. B. *L. acidophilus* auf diesem Nährboden nicht erfasst werden (Hamilton-Miller & Shah, 1998). Eine Alternative zur Anzüchtung von Laktobazillen (inklusive Vancomycin sensibler Spezies) stellt der MRS-Agar dar (de Man et al., 1960), welcher jedoch aufgrund seiner wesentlich geringeren Selektivität auch das Wachstum anderer Keime (z. B. *Streptococcus* spp.) zulässt, was wiederum die Auswertung der *Lactobacillus* spp.-Keimzahlen erheblich erschwert (Hartemink & Rombouts, 1999). Nach Abwägung dieser Kriterien wurde hier LAMVAB-Agar zur Quantifizierung der *Lactobacillus* spp. eingesetzt, zumal *L. acidophilus* auch auf dem hier ebenfalls eingesetzten Schaedler-Agar wächst und sogleich dort detektiert werden kann.

Obligate Anaerobier waren bei allen 3 Tiergruppen vorzufinden, wobei bei den physiologisch inokulierten und den keimfrei gehaltenen Küken ausschließlich aus Mukosaproben obligat anaerobe Keime subkultiviert und identifiziert werden konnten. Dies überrascht zunächst, da ältere, ebenfalls auf klassischen bakteriologischen Methoden beruhende Studien von einer Dominanz obligater Anaerobier in den Zäka von Broilern berichten (Barnes *et al.*, 1972; Mead & Adams 1975; Salanitro *et al.*, 1974) Dabei gilt zu beachten, dass insbesondere obligat anaerobe Mikroorganismen häufig nicht oder nur schwer anzüchtbar sind. Schaedler-Agar ist für die Anzucht anspruchsvoller anaerober Bakterien wie beispielsweise Clostridien und *Bacteroides* geeignet (Schaedler, 1965). Durch Zugabe von Schafblut und Vitamin K wird das Wachstum obligat anaerober Keime weiter gefördert. Dennoch sind offensichtlich trotz optimierter Medien einige anaerobe Mikroorganismen nur schwer anzüchtbar (Stanley *et al.*, 2014); auch aus diesen Gründen stellen die erfolgten molekularbiologischen Untersuchungen – mit denen letztendlich auch die Präsenz obligater Anaerobier im Darminhalt gezeigt wurde – eine wertvolle Ergänzung dar.

Aus den 20 aus Finnland übermittelten Kloakentupfern von Schneehühnern konnten – mit Ausnahme eines *E. coli*-Isolats – ausschließlich Enterokokken angezüchtet werden. Da es unwahrscheinlich erscheint, dass die Mikrobiota der Kloake von Schneehühnern nur aus diesen Keimen besteht, kann anhand der Kloakentupferproben keine Aussage über die quantitative und qualitative Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms der Tiere getroffen werden. Vermutlich ist das geringe Keimspektrum im Probenmaterial auf den langen Transportweg zurückzuführen.

2.2 Phänotypische Antibiotikaresistenzraten

Sowohl *E. coli* als auch Bakterien der Gattung *Enterococcus* gelten als Indikatorkeime für das Vorkommen von Antibiotika-Resistenzen und werden zur Evaluierung von Resistenzsituationen herangezogen, da sie zum einen ubiquitär verbreitet sind und häufig auch im Magen-Darmtrakt von Mensch und Tier vorkommen, zum anderen besitzen diese Mikroorganismen eine Vielzahl von natürlichen und zum Teil auch erworbenen Resistenzdeterminanten gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Weiterhin sind sie u. a. als Erreger nosokomialer Infektionen von humanmedizinischer Bedeutung (Peters *et al.*, 2003). *E. coli* repräsentiert hierbei das gramnegative Spektrum der intestinalen Mikrobiota, während *Enterococcus* spp. als Vertreter der grampositiven kommensalen Darmkeime herangezogen werden (EFSA, 2008).

Der Abgleich der Minimalen Hemmstoffkonzentrationen (MHK) mit entsprechenden Grenzwerten (zusammengestellt in Schwaiger *et al.*, 2013) zeigten, dass für die Indikatorspezies *E. coli* bereits am ersten Lebenstag der physiologisch inokulierten Tiere beträchtliche Resistenzraten nachweisbar waren. Auch die aus Blinddarmproben von konventionell aufgezogenen Küken isolierten *E. coli* wiesen gegen einzelne Antibiotika beachtliche Resistenzen auf. Dies belegt die Wichtigkeit eines kontrollierten physiologischen Inokulums, das frei von antibiotikaresistenten Bakterien ist.

Zum anderen ergab die Analyse der phänotypischen Resistenz für die Indikatorspezies *E. coli* von Tag 1 zu späteren Tagen (max. Tag 7) abnehmende Resistenzraten für die physiologisch inokulierten Küken und zunehmende Resistenzraten für die konventionell gehaltenen Tiere.

Ähnliche Beobachtungen machten Bortolaia *et al.* (2010): Sie untersuchten das Auftreten β -lactam- und (fluoro)quinolonresistenter *E. coli* in gesunden, unbehandelten Broilerherden entlang der Produktionskette und fanden heraus, dass auch in unbehandelten Herden (ohne Selektionsdruck) antibiotikaresistente Keime mit hoher genotypischer Heterogenität vorhanden sind. Die Autoren verweisen dabei auf die vertikale Übertragung von Keimen durch vorhergehende Generationen (Bortolaia *et al.*, 2010).

Eine Erklärung für die abfallenden Resistenzraten der aus physiologisch inokulierten Volierentieren isolierten *E. coli* könnte sein, dass die Expression von Antibiotikaresistenzgenen einen energieverbrauchenden Prozess darstellt (Nichols *et al.*, 1992). Dies kann für die resistenten Keime im Intestinaltrakt der Küken bei gleichzeitiger Entwicklung eines physiologischen zäkalen Mikrobioms bei der Konkurrenz um Platz und Ressourcen einen Nachteil darstellen.

3 Einordnung der Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen

Die PCR-SSCP (Polymerase-Chain-Reaction-Single-Strand-Conformation-Polymorphism) Technik wurde ursprünglich in der Medizin als Methode zur Mutationsanalyse entwickelt (Orita *et al.*, 1989) und später zu einem molekularbiologischen Fingerprintverfahren weiterentwickelt, mit dem die Diversität mikrobiologischer Gemeinschaften in unterschiedlichen Probenmaterialien untersucht werden kann (Schwieger & Tebbe, 1998).

Der große Vorteil dieses Verfahrens gegenüber klassischen bakteriologischen Methoden liegt darin, dass dadurch auch nicht- bzw. nur schwer anzüchtbare Bakterien erfasst werden können. Dabei bestehen die Einzelkomponenten (Banden) der SSCP-Profile im Idealfall aus dem DNA-Abschnitt eines einzelnen Organismus, jedoch können verschiedene SSCP-Banden durchaus von demselben Keim hervorgerufen werden. Dies kann zum einen dadurch entstehen, dass viele Bakterien über mehrere, etwas unterschiedliche rRNA-Gene verfügen (Brinkmann, 2006), zum anderen können einzelsträngige DNA-Sequenzen mehrere stabile Konformationen (davon eine dominante) einnehmen (Sunnucks *et al.*, 2000). Hinzu kommt, dass bereits ein Basenaustausch zu einer völlig anderen Sekundärstruktur der DNA und somit zu verändertem Laufverhalten führen kann (Orita *et al.*, 1989). Umgekehrt besteht die Möglichkeit, dass eine

starke Bande im Polyacrylamidgel durch die Überlagerung verschiedener Sequenzen entstanden ist (Schmalenberger & Tebbe, 2003). Auch aus diesen Gründen lässt die Intensität einzelner Banden nur ungefähre Rückschlüsse auf Keimzahlenverhältnisse zu, jedoch gibt es im Allgemeinen eine gute Korrelation zwischen der Komplexität der SSCP-Profile und der strukturellen Vielfalt der ausgewählten mikrobiellen Gemeinschaft (Brinkmann, 2006). Über digitale Bildanalyse und geeignete Software wie z. B. GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) können gemeinsame und abweichende Banden in Gelen identifiziert sowie Unterschiede auch semiquantitativ beschrieben werden. Banden aus SSCP-Profilen lassen sich außerdem problemlos sequenzieren (Brinkmann, 2006).

So hat sich die PCR-SSCP Methode zur Darstellung von mikrobiellen Diversitäten und von Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung von Probenmaterial sehr gut bewährt (Nocker *et al.*, 2007). Große Probenmengen können basierend auf Unterschieden in ihrer primären DNA-Sequenz gleichzeitig, zuverlässig und schnell analysiert werden, außerdem ist diese Methode sensitiv genug, um auch Bakterien(populationen) zu erfassen, die weniger als 1,5 % einer mikrobiellen Gemeinschaft ausmachen (Lee *et al.*, 1996). Des Weiteren erwies sich die PCR-SSCP-Methode im Vergleich zu anderen Fingerprintverfahren (wie z. B. DGGE) als gut reproduzierbar (Korthals *et al.*, 2008).

Bei der optischen Betrachtung der SSCP-Gele wird deutlich, dass bei den drei beprobten Tiergruppen – Küken aus Volieren-, Käfig- und Maststallhaltung – zu frühen Zeitpunkten (0 h, 24 h) nur eine geringe Anzahl an Banden detektiert werden konnte. Dies ändert sich mit zunehmendem Alter der Tiere und spiegelt die steigende Diversität des intestinalen Mikrobioms mit zunehmendem Lebensalter wieder. Diese Beobachtung deckt sich mit zahlreichen früheren Studien, die zeigten, dass sich aus dem primär nahezu unbesiedelten Darmtrakt des Jungtieres mit zunehmendem Alter über eine zunächst einfache, instabile Gemeinschaft ein relativ komplexes und stabiles Ökosystem entwickelt (Lu *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2008; Crhanova *et al.*, 2010).

Die Sequenzierung ausgewählter dominanter Banden im SSCP-Gel von 7 Tage alten Küken aus Volieren- und Maststallhaltung ergab sehr deutliche Unterschiede der intestinalen Mikrobiota. Dies bestätigte auch die Analyse der Bandenmuster

und -diversität im SSCP-Gel: Der Jaccard-Koeffizient, der ein Maß für die Übereinstimmung darstellt, lag auf Genusebene im Mittel bei 0,125, auf Spezies-Ebene bei 0 im Inhalt und bei 0,125 für die Mukosa-assoziierten Banden.

Darüber hinaus veranschaulichte die Sequenzanalyse, dass das intestinale Mikrobiom der Volierentiere, welche Kontakt zu Althennenstreu hatten, sowohl in Blinddarminhalt als auch in der zäkalen Mukosa von obligaten Anaerobiern dominiert wurde. So konnten in Proben dieser Tiergruppe z. B. Sequenzen von *Faecalibacterium prausnitzii*, *Alistipes* spp. und *Bacteroides* spp. detektiert werden. In den zäkalen Mukosaproben der konventionell gehaltenen Tiere hingegen zeigte sich bei allen sechs zum Zeitpunkt sieben Tage beprobten Küken eine sehr intensiv ausgeprägte Bande im Polyacrylamidgel, die durch Sequenzierung als *Escherichia* sp. identifiziert werden konnte. Diese Bande auf Höhe von *E.coli* des Speziesstandards konnte bei zwei der sechs an ihrem 7. Lebenstag im Mastbetrieb beprobten Hühnern auch im SSCP-Gel der Darminhaltspalten detektiert werden, hier zeigte sich die Bande jedoch mit deutlich geringerer Intensität. So wurde deutlich, dass die vorherrschenden *Escherichia* sp. im Zäkum der konventionell gehaltenen Tiere sehr stark an die Mukosa angehaftet waren.

Adhärenz von Bakterien an Oberflächen (z. B. Epithelzellen) ist eine Voraussetzung für die Kolonisation eines Wirtsorganismus (Valentin-Weigand, 2010). So wird es beispielsweise im Magen-Darm-Trakt möglich, dem Abtransport durch peristaltische Bewegungen zu entgehen (Fuller, 1984). Die den Darm besiedelnden kommensalen Keime besitzen diverse Haftorganellen oder adhäsive Oberflächenstrukturen und verfügen über molekulare Haftmechanismen, um im Biotop Darm persistieren bzw. kolonisieren zu können (Schulze et al., 2008). Adhärenz gilt allerdings auch als wesentliches Pathogenitätsmerkmal eines pathogenen Mikroorganismus und die Bindung an spezifische Rezeptorstrukturen der intestinalen Epithelzellen stellt hier den ersten Schritt einer Infektion dar (Torres et al., 2005; Mayr, 2007).

Die Spezies *Escherichia coli* umfasst apathogene, fakultativ pathogene sowie obligat pathogene Stämme. Es handelt sich um gramnegative, ubiquitär verbreitende Mikroorganismen, die sowohl aerob als auch anaerob wachsen und insbesondere im feuchten Milieu eine hohe Tenazität zeigen aber auch in angetrocknetem Kot über Monate vermehrungsfähig bleiben können (Mayr,

2007). Während diese Bakterien teilweise in der Lage sind, gereinigte Oberflächen zu kolonisieren (Reidl, 2009), stellen insbesondere gramnegative obligat anaerobe Keime erhöhte Ansprüche an ihre Umwelt (Selbitz *et al.*, 2010). Diese Umstände stellen eine mögliche Erklärung für die Dominanz von *Escherichia* spp. im mukosalen Mikrobiom von konventionell gehaltenen Küken aus Maststallhaltung dar.

Die Tiere aus Volierenhaltung hatten im Gegensatz zu den konventionell gehaltenen Küken sowohl über das Ei als auch über die Einstreu, auf der zuvor Althennen lebten, Kontakt zur autochthonen Darmmikrobiota erwachsener Hühner. Physiologisch dominieren im Zäkum obligate Anaerobier (Fuller, 1984; Lu *et al.*, 2003); wie die Sequenzanalyse der PCR-SSCP-Gele an Tag 7 der Probennahme zeigt, ist dies bei den physiologisch inokulierten Tieren der Fall.

Ein physiologisch entwickeltes intestinales Mikrobiom bildet über das Prinzip der „competitive exclusion“ eine Barriere gegen unerwünschte pathogene Keime, die den Wirt durch ihre Anwesenheit im Darm erheblich schädigen können (Nurmi & Rantala, 1973). Zu dieser Schutzwirkung scheinen obligat anaerobe Bakterien einen erheblichen Teil beizutragen (Schneitz, 2005). Der wahrscheinlich wichtigste Mechanismus ist dabei die direkte Konkurrenz um intestinale Bindungsstellen an der Darmschleimhaut/im Mukus bzw. das Blockieren von Bindungsstellen für Pathogene (Methner, 2000; Lan *et al.*, 2005; Schneitz 2005). Außerdem werden zahlreiche weitere Prozesse, wie der sich ändernde pH-Wert durch die von Anaerobiern produzierten flüchtigen Fettsäuren, die Konkurrenz um Nährstoffe und die Wirkung hemmender Substanzen (H_2S , Bakteriozine, dekonjugierte Gallensalze) in Betracht gezogen (Barnes *et al.*, 1979; Savage, 1987; Corrier *et al.*, 1995; Schneitz *et al.*, 1998).

Um die SSCP-Gelprofile der jeweils zeitgleich gehaltenen Tiergruppen an ihrem siebten Lebenstag zu vergleichen, wurden die erstellten Gele mit Hilfe der Software GelCompar II ausgewertet. Der Vergleich der Bandenmuster von PCR-Amplifikaten nach Auffaltung im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel ergab zu diesem Zeitpunkt deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen:

Es zeigte sich, dass das Mikrobiom der zäkalen Mukosa von keimarm gehaltenen Käfigtieren und konventionell aufgezogenen Masthühnern innerhalb der jeweiligen Gruppe die größte Übereinstimmung aufwies (74,3 % bzw. 64,2 %).

Zwei der drei physiologisch inokulierten Küken, deren Bandenprofile sich untereinander zu 75,6 % glichen, wiesen außerdem eine Übereinstimmung von 55,5 % mit den SSCP-Gelprofilen der keimarm gehaltenen Jungtiere auf. Zu beachten gilt dabei, dass die ungewaschenen Bruteier, aus dem die Küken dieser beiden Gruppen später schlüpften, zum selben Zeitpunkt aus derselben Brüterei bezogen wurden. Beide Tiergruppen wurden in der Folge unter Versuchsbedingungen am Lehrstuhl für tiermedizinische Physiologie unter Betreuung derselben Personen ausgebrütet, aufgezogen und beprobt. Diese übereinstimmenden Umweltfaktoren bilden eine mögliche Erklärung für die teilweise vorhandene Übereinstimmung in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms der Küken aus Volieren- und Käfighaltung, da Umweltfaktoren einen immensen Einfluss auf die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Huhn ausüben (Yin *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2013).

Die Ähnlichkeit zwischen Bandenprofilen von Tieren aus unterschiedlichen Stallabteilen im Mastbetrieb lag auf vergleichbarem Niveau zur Ähnlichkeit der – in derselben Einrichtung – physiologisch inokulierten und keimarm gehaltenen Tiere. Auch für die konventionell aufgezogenen Hühner in unterschiedlichen Stallabteilen stellen die Brüterei und das betreuende Personal den verbindenden Faktor zwischen den Gruppen dar, die ansonsten stark von ihrer Umwelt beeinflusst werden. Allerdings waren die Bruteier hier desinfiziert worden, sodass keine Keime von den Eischalen anzüchtbar waren, somit scheinen andere Faktoren (Personal, Futter, Gerätschaften) im Vordergrund zu stehen.

Die UPGMA-Analyse der Ähnlichkeit (%) der PCR-SSCP-Bandenmuster von zäkalen Darminhaltspuben zeigte, dass sich die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms der physiologisch inokulierten und der konventionell gehaltenen Tiere stark unterschied (vgl. auch S. 150). Eine Ausnahme stellte Probe H 24 K dar, die von einem konventionell aufgezogenen Tier stammte und eine 73,9 %ige Übereinstimmung zur Probe eines physiologisch inokulierten Tieres aufwies. Allerdings ergab die Analyse der laufweitengleichen Banden unterschiedliche zugrunde liegende Sequenzen, so dass sich die vermeintlich hohe Ähnlichkeit letztlich als ein Artefakt erwies.

Wie bereits frühere Studien zeigten, wird die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota auch beim frisch geschlüpften Küken zu einem erheblichen Anteil von dessen direkter belebter Umwelt geprägt (Yin *et al.*, 2010). Unterschiedliche

Umweltbedingungen können zu großen Variationen im intestinalen Mikrobiom von Küken führen (Fuller, 1998; Stanley *et al.*, 2013). Solche Schwankungen in der Zusammensetzung der Darmflora wurden auch bei Puten und anderen Tierarten sowie beim Menschen beobachtet und dabei sowohl Umwelt- als auch wirtseigenen Faktoren zugeschrieben (Zoetendal *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2000). Van der Wielen *et al.* (2002) zeigten außerdem, dass auch einzelne Hühner, die unter identischen Bedingungen aufgezogen wurden, für jeden Darmabschnitt eine individuelle mikrobielle Zusammensetzung aufweisen können. Dies legt den Einfluss wirtsspezifischer Faktoren auf die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Huhn nahe (van der Wielen *et al.*, 2002). Um welche Faktoren es sich hierbei im Einzelnen handelt ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Genotyp und Geschlecht des Wirtes spielen dabei eine Rolle, außerdem seine immunologische Eigenschaften sowie weitere Kommunikationssysteme zwischen Wirt und Bakterium (Zoetendal, 2001; Zhao *et al.*, 2013; Stanley *et al.*, 2013).

4 Immunologische Befunde

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Projekts „Beeinflussung der Entwicklung einer natürlichen Darmflora und effizienten Abwehrbarriere im Darm beim Huhn als Alternative zur Antibiotikumanwendung“ angefertigt. Innerhalb dieses Projekts wurde neben der Entwicklung der intestinalen Mikrobiota auch deren Einfluss auf die Entwicklung des Mukosa-assoziierten Immunsystems von Küken aus unterschiedlichen Haltungsformen immunhistochemisch untersucht. Dabei konnte innerhalb der ersten Lebenswoche der Tiere kein Einfluss der Mikrobiota auf das Immunsystem nachgewiesen werden. Die Küken aus Volieren- und Käfighaltung wiesen auch an Tag 7 ein hochgradig unterentwickeltes erworbenes Immunsystem auf, ebenso unbeeinflusst blieben Anzahl und Verteilung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Granulozyten (unveröffentlichtes Material Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München). Diese Hypothese konnte bei der Untersuchung von keimfrei gehaltenen Hühnern und Tieren aus Maststallhaltung (über einen Zeitraum von 55 Tagen), welche am Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt wurde, bestätigt werden. Auch hier zeigten sich innerhalb der ersten Lebenswoche der Tiere noch keine erheblichen Unterschiede in der erworbenen Immunität. Insofern ist unklar, ob die

deutlichen Unterschiede in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota tatsächlich ohne Folge für die Entwicklung des Darmimmunsystems blieb; hierzu wäre eine Beprobung der Tiere in höherem Lebensalter (und somit von Beginn an der Einschluss und die Tötung einer höheren Tierzahl) nötig gewesen. Aufgrund der räumlichen Verhältnisse (Gruppenhaltung) war dies nicht möglich, zumal im ersten Versuchsansatz – mit dem Ziel, die frühe Entwicklung der Mikrobiota beim Huhn zu dokumentieren – eine engmaschige Probenahme innerhalb der ersten 48 Lebensstunden nötig erschien.

5 Auswahl potentieller Inokulumstämme

5.1 Kriterien zur Auswahl potentieller Inokulumstämme

Basierend auf der Analyse des intestinalen Mikrobioms von Tieren aus unterschiedlichen Haltungsformen wurden potentiell protektive Vertreter – im Sinne einer „competitive exclusion“ – aus Schneehuhnproben ausgewählt und weiter charakterisiert. Da es für die Auswahl potentieller Inokulumstämme entscheidend ist, lebende und anzüchtbare Mikroorganismen zu gewinnen, fanden hier insbesondere Ergebnisse der kulturellen mikrobiologischen Untersuchungen Berücksichtigung.

Sowohl in der Gruppe der keimarm gehaltenen Käfigtiere als auch bei Küken aus Maststallhaltung zeigten sich *Lactobacillus* spp. im zäkalen Mikrobiom der Tiere deutlich unterrepräsentiert. *Enterococcus* spp. waren im Blinddarm der konventionell aufgezogenen Masttiere innerhalb der ersten 48 h in Größenordnungen von 10^8 – 10^9 KbE pro cm^3 Darm (Darminhalt) bzw. 10^6 KbE pro cm^2 Darm (Mukosa) vorzufinden, hingegen waren bei Küken aus Käfighaltung innerhalb der ersten sieben Lebenstage nur sporadisch Enterokokken nachweisbar. Sowohl die Gattung *Lactobacillus* als auch *Enterococcus* spp. zählen zu den Milchsäurebakterien, welche aufgrund ihrer förderlichen Eigenschaften (wie z. B. pH-Wert Senkung, Konkurrenz um Nährstoffe und Rezeptoren, Bildung antimikrobieller Substanzen) im Darm eine Schutzwirkung vor Pathogenen entfalten können (Fuller, 1989; Holzapfel *et al.*, 1998). Daher kommen diese Mikroorganismen häufig in Form von Probiotika zum Einsatz (Klein *et al.*, 1998); Enterokokken-Stämme finden vor allem in der Schweine- und Geflügelhaltung Anwendung, wo sie auch aufgrund wachstumsfördernder Effekte eingesetzt

werden. Teilweise werden Enterokokken-Stämme aber auch als Therapeutikum beim Menschen genutzt (Klein, 1998; Franz *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2011).

Aus Kloakentupferproben von Schneehühnern konnten von Vertretern der Milchsäurebakterien keine Laktobazillen, jedoch *Enterococcus* spp. angezüchtet werden.

Vahjen *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die Fütterung junger Puten mit *Enterococcus faecium* SF68 zu einer erhöhten Milchsäurekonzentration im Gastrointestinaltrakt der Tiere führte, wodurch die Stoffwechselaktivität anderer Milchsäurebakterien, insbesondere Laktobazillen, im Dünndarm stimuliert wurde; dies kann möglicherweise zu einem Schutz der Tiere vor gastrointestinalen Infektionen beitragen (Franz *et al.*, 2011). Samli *et al.* (2007) untersuchten in einer Studie probiotische Effekte von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 beim Masthähnchen und stellten ebenfalls eine erhöhte Kolonisation von Milchsäurebakterien im Darminhalt des Ileums und eine signifikant erhöhte Exkretion von Milchsäurebakterien bei *Enterococcus faecium* inokulierten Tieren fest. Zudem verbesserten sich Gewichtszunahme und Futterverwertungsrate der Hühner (Samli *et al.*, 2007).

Frisch geschlüpfte Küken, welchen kurze Zeit nach dem Schlupf *Enterococcus faecium* J96 verabreicht wurde, zeigten in einer Studie von Audisio *et al.* (2000) verminderte Empfänglichkeit gegenüber *Salmonella Pullorum*, bei bereits infizierten Küken hatte dieser Stamm jedoch keinen therapeutischen Effekt.

Basierend auf den dargestellten Studien wurden Isolate der Spezies *Enterococcus faecium* (n = 8) sowie *Enterococcus mundtii* (n = 16) aus Proben von Schneehühnern in Hinblick auf ihre Eignung als Inokulumstämme evaluiert. Sie sollen letztendlich innerhalb eines definierten Konsortiums aus Bakterienstämmen unterschiedlicher Gattungen bzw. Spezies mit dem Ziel einer „competitive exclusion“ frisch geschlüpften Küken inokuliert werden.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass Bakterien der Gattung *Enterococcus* keinen GRAS-Status (GRAS: „Generally Recognized As Safe“) besitzen, da *Enterococcus* spp.-Stämme als Erreger nosokomialer Infektionen identifiziert werden konnten. Zudem zeigen viele Stämme Resistenzen gegenüber einem breiten Spektrum von Antibiotika. Aus diesen Gründen muss die Sicherheit von

Isolaten, welche in der Tierhaltung zur Anwendung kommen sollen, genau überprüft werden (Franz *et al.*, 2011; Araujo & Ferreira, 2013).

5.2 Antibiotikaresistenzen

Verschiedene *Enterococcus* spp.-Stämme sind Träger transferierbarer (Multi-) Resistenzen gegen antimikrobiell wirksame Wirkstoffe (Klein, 2003; Franz *et al.*, 2011), zudem ist eine Prüfung der phänotypischen Antibiotikaresistenz bei Stämmen, welche in der Tierhaltung eingesetzt werden sollen, unverzichtbar (EFSA, 2012).

Grundsätzlich kann zwischen der intrinsischen und der extrinsischen Antibiotikaresistenz von Bakterien unterschieden werden. Die intrinsische/natürliche Resistenz ist chromosomal codiert und bei allen Keimen einer bestimmten Spezies vorzufinden (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001; Marothi *et al.*, 2005), wohingegen die extrinsische Resistenz erworben wird. Sie kann durch Mutationen chromosomaler Gene entstehen oder durch horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien übertragen werden, wobei hohe Populationsdichten, wie sie auch im Darm anzutreffen sind, die Übertragung von Resistenzgenen begünstigen (Feuerpfeil, 1999; Hartmann, 2005). So sind Enterokokken z. B. intrinsisch resistent gegen eine Vielzahl von Antibiotika, wie Clindamycin, Lincosamide, Penicillin G und Cephalosporine (Moellering, 1991; Klare *et al.*, 2012); erworbene Resistenzen können bei diesen Mikroorganismen beispielsweise gegen Substanzen wie Chloramphenicol, Tetracycline sowie Ampicillin und Fluorchinolone vorliegen (Acar & Buu-Hoi, 1988; Klare *et al.*, 2012). Beginnend am Ende der 80er Jahre nahm zudem die Häufigkeit der Glycopeptidresistenz bei Enterokokken zu. Als mögliche Ursache hierfür wurde auch die Verwendung des inzwischen nicht mehr zugelassenen Glykopeptid-Antibiotikums Avoparcin als Leistungsförderer bei Geflügel und Schweinen gesehen (Klare & Witte, 1997). Bei Enterokokken lassen sich 6 Vancomycin-Resistenztypen unterscheiden, neben einer natürlichen Resistenz (VanC), die sich bei *Enterococcus gallinarum* und *Enterococcus casseliflavus* finden lässt, existieren 5 erworbene Resistenztypen, wobei unter den erworbenen Resistenzen VanA und VanB (Hauptreservoir: *Enterococcus faecium*) die größte klinische Bedeutung haben (Klare *et al.*, 2012).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Mikrodilutionsverfahren evaluierten *Enterococcus* spp. aus Kloakentupferproben von Schneehühnern zeigten sich frei von erworbener Antibiotikaresistenz und wurden daher in weiteren Versuchen auf ihre Eignung als potentielle Inokulumstämme geprüft. Zwar wurden bei den *Enterococcus*-Isolaten aus physiologisch inokulierten Tieren ebenfalls nur vereinzelt Resistenzen gegen humanmedizinische Wirkstoffe mit entsprechend festgelegten EUCAST-Grenzwerten gefunden, der Blick auf die „epidemiologische Antibiotika-Resistenz“ zeigt jedoch im Vergleich der MHK-Werte zu Wildtyp-Werten, dass die Isolate häufig erworbene Resistenzen trugen: So wiesen 14 der 20 *Enterococcus faecalis*-Isolate aus Versuch 1 (Voliere) erworbene Doxycylinresistenzen auf; drei der Isolate ohne eine solche Resistenz waren resistent gegen Makrolide, auch die verbliebenen drei Isolate zeigten verglichen zum Wildtyp erhöhte MHK-Werte für einzelne Substanzen. Ähnlich stellte sich die Situation bei *Enterococcus faecium* dar.

5.3 Zytotoxizität

Wie bereits erwähnt besitzen Bakterien der Gattung *Enterococcus* keinen GRAS-Status (GRAS: „Generally Recognized As Safe“), da *Enterococcus* spp. Stämme zum Teil nosokomiale Infektionserreger darstellen, welche z. B. Bakteriämie, Endokarditis, Harnwegserkrankungen und andere Infektionen, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, verursachen können (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Klare *et al.*, 2012). Dabei werden die meisten von *Enterococcus* spp. hervorgerufenen Infektionen durch *Enterococcus faecalis* verursacht (60 – 95 %), gefolgt von *Enterococcus faecium* (5 – 40 %) (Franz *et al.*, 2011; Klare *et al.*, 2012); weitere *Enterococcus* spp., wie auch *Enterococcus mundtii* treten nur selten als Infektionserreger beim Menschen auf, wobei darauf hingewiesen wird, dass klinische biochemische Differenzierungssysteme *Enterococcus mundtii* Isolate fälschlicherweise als *Enterococcus faecium* identifizieren können, woraus ein verzerrtes Bild hinsichtlich der Beteiligung von *Enterococcus mundtii*-Stämmen an Infektionsgeschehen resultieren kann (Jett *et al.*, 1994; Higashide *et al.*, 2005). Enterokokken-Infektionen besitzen im veterinärmedizinisch-klinischen Bereich nur geringe Bedeutung, doch auch bei Tieren sind Erkrankungen durch Infektionen mit *Enterococcus* spp. beschrieben, wobei die Keime z. B. bei Kühen sporadisch und meist sekundär hochakut-septikämische bis chronisch-lokalisierte Krankheitsgeschehen auslösen können (Jung & Rautenschlein, 2014).

Bei Enterokokken-Stämmen kommen regelmäßig Virulenzfaktoren vor; diese Determinanten waren insbesondere bei klinischen Stämmen nachzuweisen, konnten jedoch teilweise auch bei Enterokokken-Stämmen, welche aus Starterkulturen oder aus Lebensmitteln isoliert wurden, detektiert werden (Eaton & Gasson, 2001).

Um mögliche zytotoxische Effekte potentieller Inokulumstämmen ($n = 24$) auf Stoffwechselfparameter von Zellen zu überprüfen kam der MTT-Test zur Anwendung. Einflüsse auf die Reduktion von MTT zu Formazan durch Verozellen waren bei den evaluierten *Enterococcus faecium* ($n = 8$) und *Enterococcus mundtii* ($n = 16$) Isolaten (wenn überhaupt) nur in sehr geringem Ausmaß nachzuweisen.

5.4 RAPD-PCR

Bei der Feintypisierung der *Enterococcus mundtii*- Isolate lassen die Bandenmuster der RAPD-PCR-Amplifikate im 1 %igen Agarosegel auf mindestens zwei klonale Linien der 16 getesteten Isolate schließen. Die Bandenmuster von RAPD-PCR Produkten der acht überprüften *Enterococcus faecium*-Isolate weisen auf mindestens drei klonale Linien hin. Um eine mögliche Klonalität von Isolaten zu überprüfen wäre es sinnvoll, diese durch multilocus-sequence-typing weiter zu charakterisieren.

5.5 Antimikrobielle Aktivität

In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte die Überprüfung der Isolate auf ihre antimikrobielle Aktivität. Dafür wurden pH-neutrale, bakterienzellfreie Überstände auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber Konkurrenzkeimen evaluiert; Ziel war es, auf diesem Wege die Bildung antibakterieller Substanzen (z. B. Bakteriozine) zu erfassen, denn die Schutzwirkung einer protektiven Darmflora gegenüber Pathogenen wird auch der Produktion von antibakteriellen Stoffen zugeschrieben. Dazu zählen zum einen niedermolekulare Substanzen, wie z. B. Milchsäure, flüchtige Fettsäuren und Wasserstoffperoxid, zum anderen Bakteriozine, bei welchen es sich um Peptide handelt (Savage, 1977; Franz *et al.*, 2007). Bakteriozine entfalten ihre antimikrobielle Wirksamkeit häufig gegenüber nahen Verwandten des produzierenden Bakterienstammes (Green *et al.*, 1997), sind aber zum Teil auch in der Lage, grampositive wie gramnegative Mikroorganismen anzugreifen (Ko & Ahn, 2000; Messi *et al.*, 2001, Kwaadsteniet

et al., 2005). Unter Enterokokken ist die Fähigkeit zur Bildung von Bakteriozinen, die hier auch als Enterozine bezeichnet werden und von Franz *et al.* (2007) in ein Klassifizierungsschema eingeteilt wurden, weit verbreitet (Kwaadsteniet *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2007). Häufig ist dabei ein Stamm in der Lage, mehrere Enterozine gleichzeitig zu bilden (De Vuyst *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2007). Für *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* wurde eine Vielzahl an Enterozinen beschrieben, die teilweise Aktivitäten gegen *Escherichia coli* (Pantev *et al.*, 2003) und *Salmonella Pullorum* aufweisen (Audisio *et al.*, 2000). Auch *Enterococcus mundtii* Stämme können solche antibakteriell wirksamen Peptide produzieren; diese zeigen zum Teil Aktivität gegenüber pathogenen grampositiven Keimen wie *Listeria monocytogenes*, aber auch Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien wie z. B. *Klebsiella pneumoniae* (Bennik *et al.*, 1998; Kawamoto *et al.*, 2002; Kwaadsteniet *et al.*, 2005).

Zwei *Enterococcus mundtii*-Isolate aus Kloakentupferproben vom Wildvogel zeigten beim Test auf antimikrobielle Aktivität einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von *Geobacillus stearothermophilus* und wurden anschließend in einem weiteren Versuch auf Keimkonkurrenz-Eigenschaften untersucht.

5.6 Keimkonkurrenz-Eigenschaften

Um ihre inhibitorischen Effekte als Mono-Spezies auf das Wachstum problematischer Keime *in vitro* weiter zu erfassen, wurden aufgrund vorhergehender Untersuchungen ausgewählte *Enterococcus mundtii*-Isolate (n = 2) hinsichtlich ihrer Kompetitionsfähigkeit gegenüber „Problemkeimen“ evaluiert.

Beide Isolate waren in LB-Medium überwiegend konkurrenzfähig zu *Escherichia coli* und *Salmonella* spp.

Als Mono-Inokulum zeigten beide *Enterococcus*-Isolate mit einer maximalen Reduktion von 99,6 % zwar inhibierende Wirkung auf das Wachstum eines *E. coli*-Isolates bekannter Antibiotikaresistenz, jedoch keine eindeutigen Effekte auf das Wachstum von *Salmonella* spp. Im Gegensatz dazu sahen Herich *et al.* (2010) im Infektionsversuch eine signifikant niedrigere Salmonellen-Prävalenz bei Hühnern, die mit *Enterococcus faecium* vorinokuliert worden waren, verglichen zu ausschließlich *Salmonella*-inokulierten Hühnern.

Eines der beiden *Enterococcus mundtii*-Isolate wurde in einem weiteren Keimkonkurrenz-Versuch hinsichtlich seiner inhibitorischen Einflüsse auf das Wachstum von *E. coli*-Stämmen ($n = 34$), welche zuvor aus Eintagsküken in Maststallhaltung isoliert worden waren, getestet. Diese *E. coli*-Isolate stammten von Eintagsküken aus Maststallhaltung und waren hinsichtlich ihrer phänotypischen Antibiotikaresistenz überprüft worden. So sollte *in vitro* getestet werden, ob eine verminderte Ansiedlung von potentiell pathogenen bzw. antibiotikaresistenten Keimen bei Inokulation von Küken mit *Enterococcus mundtii* D 247 800 Ent1 zu erwarten ist. Dabei zeigte der eingesetzte *Enterococcus mundtii*-Stamm keine signifikanten inhibitorischen Effekte: Im Median ging die *in vitro* Keimzahl der untersuchten *E. coli*-Isolate in Mischkultur mit dem potentiell protektiven *Enterococcus mundtii*-Isolat nur marginal zurück. Die Stämme verhielten sich uneinheitlich: 20 Stämme zeigten eine mehr oder weniger deutliche Reduktion in der Mischkultur, auf Werte von 0.1 bis 81 % der Vergleichskonzentration in Reinkultur. Hingegen zeigten 14 Stämme unbeeinträchtigtes bis hin zu – maximal 120fach – verstärktes Wachstum in der Mischkultur, verglichen zur Reinkultur. Hierbei ließ sich kein Zusammenhang mit der Antibiotikaresistenz der Stämme beobachten: Die MHK_{50} -Werte (Median) waren für die Mehrzahl der antibiotischen Wirkstoffe deckungsgleich. Unterschiede in den MHK_{90} -Werten zeigten sich bei Cefpodoxim, Gentamicin, Tobramycin, Streptomycin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol, wobei die deutlichsten Unterschiede die Wirkstoffe Streptomycin (8 vs. 128 mg/l) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1 vs. 8 mg Trimethoprim /l) betrafen; die Gruppe der *E. coli* Isolate, die in Gegenwart von *Enterococcus mundtii* unverändertes oder gesteigertes Wachstum aufwies, zeigte hierbei die höheren MHK-Werte. Somit kann eine beeinträchtigte Fitness Streptomycin- bzw. Trimethoprim-Sulfonamid-resistenter Isolate in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Etwas andere Beobachtungen machten Karami *et al.*, 2006 *in vivo* beim Menschen, sie berichten, dass antibiotika-empfindliche und -resistente Stämme zwar mit gleicher Wahrscheinlichkeit Neugeborene kolonisieren, dass aber die resistenten Stämme den sensiblen in ihrer Abundanz unterlegen sind.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit Hilfe klassischer Kultivierungsmethoden konnte u. a. verdeutlicht werden, dass Tiere unter konventionellen Mastbedingungen im Vergleich zu physiologisch

inokulierten Küken aus Volierenhaltung eine verzögerte Besiedelung des Zäkums durch Laktobazillen erfuhren, wodurch die Anheftung potentiell pathogener Enterobacteriaceae an die zäkale Mukosa begünstigt wurde.

Zum anderen zeigte die Sequenzanalyse von Zäkumproben, dass das intestinale Mikrobiom der natürlich inokulierten Küken an ihrem 7. Lebenstag von obligaten Anaerobiern dominiert wurde, was auf eine physiologische Bakterienpopulation im Blinddarm dieser Tiere schließen lässt. Das Keimspektrum des Zäkums konventionell aufgezogener Küken hingegen wurde nach einer Woche von *Escherichia* spp. beherrscht, wobei diese potentiellen Pathogene außerdem stark an der Mukosa anhafteten.

Die Indikatorspezies *E. coli* wies sowohl bei physiologisch inokulierten Tieren aus Volierenhaltung als auch bei konventionell aufgezogenen Küken aus Maststallhaltung bereits am erstem Lebenstag beachtliche Resistenzraten gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen auf. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Relevanz eines kontrollierten physiologischen Inokulums, welches über das Prinzip der „competitive exclusion“ Schutzwirkung im Gastrointestinaltrakt hochempfindlicher, frisch geschlüpfter Küken gegenüber unerwünschten pathogenen Keimen entfalten kann.

Kandidatenstämme für ein solches kontrolliertes Inokulum aus dem Darm von Schneehühnern (Finnland) zeigten sich frei von erworbenen Antibiotikaresistenzen und *in vitro* konkurrenzfähig zu *Escherichia coli* und *Salmonella* spp., wobei einheitliche inhibitorische Effekte nur gegenüber *Escherichia coli* zu beobachten waren. Im Hinblick auf die Erstellung eines komplexen kontrollierten Inokulums erscheint es zunächst notwendig, weiteres Probenmaterial gesunder, unbehandelter Hühner zu gewinnen, um die Vielfalt potentieller Inokulumstämme zu erhöhen. Die tendenziell positiven Effekte schon eines Mono-Inokulums *in vitro* lassen den Einsatz einer solchen Gruppe natürlicher Darmbakterien mit optimalem Zusammenwirken, inhibitorischem Potential gegenüber unerwünschten Keimen und ausreichender Adhärenz an Darmzellen prinzipiell geeignet erscheinen, die physiologische Besiedlung des Darms frisch geschlüpfter Küken mit einer protektiven Mikrobiota zu induzieren und so die Tiergesundheit in der Geflügelwirtschaft zu verbessern. Auf diesem Weg kann möglicherweise langfristig eine Reduktion des Antibiotikaeinsatzes in der Kükenmast erreicht werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota hat erheblichen Einfluss auf die Gesundheit des Wirts. Neben zahlreichen weiteren Funktionen ist die Entwicklung einer physiologischen Darmmikrobiota bedeutend für die Reifung des Darm-assoziierten und systemischen Immunsystems. Die intestinalen Mikroorganismen bilden zudem über das Prinzip der „competitive exclusion“ eine Barriere gegen unerwünschte pathogene Keime, die den Wirt durch ihre Anwesenheit im Darm erheblich schädigen können. In der modernen Geflügelproduktion werden hohe Hygienestandards verfolgt um (potentiell) pathogene Keime auszuschließen; gleichzeitig wird so die natürliche, physiologische Besiedlung des Darms verhindert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms im Zäkum von Küken, die ab dem Zeitpunkt des Schlupfes unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt waren, anhand klassischer Kultivierungsmethoden einschließlich phänotypischer Resistenztestung sowie mit Hilfe molekularer Techniken untersucht. Ziel war es, Erkenntnisse über die physiologische Besiedlung des Gastrointestinaltrakts frisch geschlüpfter Küken durch Mikroorganismen zu gewinnen. Im Vergleich dazu sollte außerdem die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota von Tieren, welche unter den hohen Hygienestandards konventioneller Mastbedingungen aufwachsen, analysiert werden. Kloakentupferproben von finnischen Schneehühnern (*Lagopus*, n = 20) ergänzten das Untersuchungsmaterial.

Sowohl die Ergebnisse der klassischen bakteriologischen Untersuchungen als auch die molekularbiologische Analyse mittels PCR-SSCP-Methode zeigten sehr deutliche Unterschiede in der Entwicklung des zäkalen Mikrobioms der drei untersuchten Tiergruppen – durch Althennenkot „physiologisch“ inokulierte Volierentiere (n = 21), keimarm gehaltene Küken aus Käfighaltung (n = 21) sowie konventionell aufgezogene Masthühner (n = 48). Mit Hilfe klassischer Kultivierungsmethoden konnte zum einen verdeutlicht werden, dass Masttiere unter konventionellen Produktionsbedingungen im Vergleich zu physiologisch inokulierten Küken eine verzögerte Besiedlung des Zäkums durch Laktobazillen erfuhren. Zum anderen zeigte die Sequenzanalyse bakterieller DNA aus

Zäkumproben, dass das zäkale Mikrobiom konventionell aufgezogener Küken nach einer Woche von *Escherichia* spp. dominiert wurde, wobei diese potentiellen Pathogene außerdem stark an der Mukosa anhafteten.

Die Indikatorspezies *E. coli* wies sowohl bei physiologisch inokulierte Tieren als auch bei konventionell aufgezogenen Hühnern bereits am ersten Lebenstag der Küken beachtliche Resistenzraten gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen auf. Dies verdeutlicht die Relevanz eines kontrollierten Inokulums, welches – an Eintagsküken verabreicht – zum Schutz der Tiere vor problematischen Keimbesiedlungen beitragen kann. Um Mitglieder einer solchen definierte Gruppe von physiologisch vorkommenden Bakterienisolaten mit für den Wirt nützlichen Eigenschaften zu identifizieren, wurden in der Folge Isolate (n = 24) aus Kloakentupferproben von Wildvögeln (Finnland) *in vitro* auf ihre Eignung als potentielle Inokulumstämme getestet. Dabei erwiesen sich zwei *Enterococcus mundtii*-Isolate nach Überprüfung von übertragbarer Antibiotikaresistenz, Zytotoxizität sowie antimikrobieller Aktivität gegen Pathogene als vielversprechend. Bei weiterer Evaluierung ihrer Keimkonkurrenzeigenschaften als Mono-Spezies zeigten sie sich konkurrenzfähig zu einem ESBL-bildenden aviären *E. coli*-Isolat, wie auch zu einem aviären *Salmonella*-Isolat, entfalteten jedoch gegenüber dem *E. coli*-Isolat stärkere inhibitorische Effekte. Weitere Untersuchungen im Organsystem bzw. Tierversuch sind nötig, um die *in vivo* Nutzbarkeit der Isolate als kontrolliertes Inokulum abzusichern.

VII SUMMARY

Microbial colonisation of the intestinal tract of young individuals has a significant impact on health and animal welfare. In addition to several nutritional and physiological functions, the commensal flora participates in the development and maintenance of an effective immune system. Furthermore the normal intestinal microflora protects the host against being invaded by pathogens and plays an important role in the prophylaxis of infectious diseases. Since the intestinal microbiota in newly hatched chickens, reared under conditions of intensive livestock farming, develops with delay, these animals are known to be very sensitive to infection by *Salmonella* and other enteropathogens during their first weeks of life.

In this study, the development of the microbiota in cecal contents and attached to the cecal mucosa of newly hatched chickens, exposed to different environmental conditions directly after hatching, was analyzed using both culture-dependent and culture-independent methods. In addition selected isolates were tested for their phenotypic resistance to antimicrobial agents. To this purpose cecal samples of newly hatched chicks reared under three different regimens were investigated. Straight after hatching animals of group 1 (n = 21) were moved to an aviary containing litter mixed with feces of adult hens, thus ensuring ingestion of a kind of “physiological inoculum”. This aimed to gain insights into the physiological colonisation of the gastrointestinal tract of newly hatched chicks by microorganisms. In comparison the composition of the intestinal microbiome of germ-poor kept chickens, which were placed into disinfected cages without any litter (group 2, n = 21), and of animals reared under conditions of intensive livestock farming (group 3, n = 48) was examined.

Both the results of cultural and molecular-biological analysis showed significant differences in the development of the cecal microbiota of the studied groups of animals. By means of traditional cultural methods it could be shown that – compared to “physiologically inoculated” chickens – conventionally fattened chickens experienced a delayed colonisation of the cecum by lactobacilli. In addition (PCR-SSCP-) analyses of cecal samples revealed that on the seventh day after hatching the microbiome of chickens reared under conditions of intensive

livestock farming was dominated by *Escherichia* spp. Furthermore these potentially pathogenic micro-organisms strongly adhered to the mucosa.

The indicator species *E. coli* showed significant rates of phenotypic resistance to antimicrobials in both physiologically inoculated animals and in conventionally reared chicks – already as early as their first day of life. This illustrates the importance of a “controlled inoculum”: a defined group consisting of well-characterized bacterial strains, showing antagonistic activity against (potential) pathogens which could be administered to newly hatched chickens with the objective of protecting these animals against colonisation of their intestinal tract by pathogenic micro-organisms.

In attempt to gain a subset of potential probiotics, isolates (n = 20) from cloacal swab samples from wild birds (*Lagopus*, Finland) were carefully evaluated with regard of the safety of use. After screening various parameters *in vitro* (phenotypical resistance, cytotoxicity, antimicrobial activity against pathogens), two *Enterococcus mundtii*-Isolates were further analysed in order to ascertain their competitive ability against (potentially) pathogenic micro-organisms. As the results showed both *Enterococcus mundtii*-isolates were able to compete with an avian ESBL-producing *E. coli*-strain as well as with an avian *Salmonella*-strain. Inhibitory effects against the *E. coli* strain could be revealed, however, no certain constant and no significant reduction was seen when one of the strains was further analysed with regard to inhibitory effect on *E. coli* field strains (n = 34).

Further studies in organ system or animal studies are needed to verify the *in vivo* utility of the isolates as part of a “controlled inoculum” which might be able to protect newly hatched chicks against colonisation of their intestinal tract by (potentially) pathogenic micro-organisms.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Aarestrup FM, Wegener HC (1999): The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes and Infection* 1: 639-644

Acar JF, Buu-Hoi AY (1988): Resistance patterns of important gram-positive pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 21 Supplement C: 41-47

Adil S, Magray SN (2012): Impact and manipulation of gut microflora in poultry: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11: 873-877

Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Wold AE (2006): Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: An effect of hygienic lifestyle? *Pediatric Research* 59: 96-101

Alakomi H-L, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander I (2000): Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2001-2005

Albert T, Große-Herrenthey A, Lange-Starke A, Kroeckel L (2011): Identifizierung von Staphylokokken aus Rohschinkenaufschnitt. *Rundschau Fleischhygiene, Lebensmittelüberwachung* 63: 387-390

Alexander TW, Yanke JL, Reuter T, Topp E, Read RR, Selinger BL, McAllister TA (2011): Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different subtherapeutic antibiotics. *BMC Microbiology* 11: 19

Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010): Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8: 251-259

Alroy J, Goyal V, Lukacs NW, Taylor RL, Strout RG, Ward HD, Pereira ME (1989): Glycoconjugates of the intestinal epithelium of the domestic fowl (*Gallus domesticus*): a lectin histochemistry study. *The Histochemical Journal* 21: 187-193

- Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z (2004): Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science* 83: 1093-1098
- Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F (2001): Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research* 68: 303-316
- Apajalahti J, Kettunen A, Graham H (2004): Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *Worlds Poultry Science Journal* 60: 223-232
- Apajalahti JHA, Kettunen A, Bedford MR, Holben WE (2001): Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5656-5667
- Apajalahti JHA, Sarkilahti LK, Maki BRE, Heikkinen JP, Nurminen PH, Holben WE (1998): Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytosine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4084-4088
- Araujo TF, Ferreira CLDF (2013): The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 457-466
- Artis D (2008): Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology* 8: 411-420
- Audisio MC, Oliver G, Apella MC (2000): Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. *Journal of Food Protection* 63: 1333-1337
- AWT (1999): Probiotika in der Tierernährung. Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e. V. (Hrsg.); Verlag Agrimedia, Bonn.
- Bachmeier J (2012): Antibiotikareduktion beim Hähnchen in der täglichen Praxis. In: Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette, Tagungsband BfR-Symposium S. 68-70.
- Bailey JS, Cason JA, Cox NA (1998): Effect of *Salmonella* in young chicks on competitive exclusion treatment. *Poultry Science* 77: 394-399

- Bare L, Wiseman R (1964): Delayed appearance of lactobacilli in the intestines of chicks reared in a "new" environment. *Applied Microbiology* 12: 457-459
- Barnes EM, Barnum DA, Harry EG, Mead GC (1972): Intestinal flora of chicken in period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to anaerobic bacteria. *British Poultry Science* 13: 311
- Barnes EM, Impey CS, Cooper DM (1980a): Competitive-exclusion of salmonellas from the newly hatched chick. *Veterinary Record* 106: 61-61
- Barnes EM, Impey CS, Cooper DM (1980b): Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *American Journal of Clinical Nutrition* 33: 2426-2433
- Barnes EM, Impey CS, Stevens BJH (1979): Factors affecting the incidence and anti-salmonella activity of the anaerobic cecal flora of the young chick. *Journal of Hygiene* 82: 263-283
- Barrow P (1992) Probiotics for chickens. In: Fuller, R. (Hrsg.): *Probiotics*. Springer Netherlands, Houten.
- Bassam BJ, Caetanoanollés G, Gresshoff PM (1991): Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83
- Befus AD, Johnston N, Leslie GA, Bienenstock J (1980): Gut-associated lymphoid-tissue in the chicken. 1. Morphology, ontogeny, and some functional-characteristics of peyers patches. *Journal of Immunology* 125: 2626-2632
- Bejuk D, Begovac S, Gamberger D, Kucisec-Tepes N (2000): Evaluation of phenotypic characteristics for differentiation of enterococcal species using an example based algorithm. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 38: 201-205
- Bennik MHJ, Vanloo B, Brasseur R, Gorris LGM, Smid EJ (1998): A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1373: 47-58
- Blaut M, Loh G (2009): Aufbau und Funktion der intestinalen Mikrobiota des Menschen. In: Bischoff, S.C. (Hrsg.): *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika*. Thieme, Stuttgart.

- Bonnedahl J, Jarhult JD (2014): Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala Journal of Medical Sciences* 119: 113-116
- Bortolaia V, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM (2010): High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from italian broiler flocks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 1623-1626
- Brandt P (2010): Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL): Berichte zur Lebensmittelsicherheit, BVL-Reporte. 4: 5-14
- Braun EJ (2003): Regulation of renal and lower gastrointestinal function: role in fluid and electrolyte balance. *Comparative Biochemistry and Physiology a- Molecular & Integrative Physiology* 136: 499-505
- Brinkmann N (2006): Mikroorganismen auf der Spur. *Biospektrum Heidelberg* 12: 78
- Brisbin JT, Zhou H, Gong J, Sabour P, Akbari MR, Haghighi HR, Yu H, Clarke A, Sarson AJ, Sharif S (2008): Gene expression profiling of chicken lymphoid cells after treatment with *Lactobacillus acidophilus* cellular components. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 563-574
- Brooker BE, Fuller R (1975): Adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelium. *Journal of Ultrastructure Research* 52: 21-31
- Bry L, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI (1996): A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 273: 1380-1383
- BTK (2010): Bundestierärztekammer (BTK), Arbeitsgruppe Tierarzneimittel (AGTAM) der Länderarbeitsgemeinschaft Verbraucherschutz (2010): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit Tierarzneimitteln – mit Erläuterungen. Beilage zum deutschen Tierärzteblatt (10).
- Buffie CG, Pamer EG (2013): Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology* 13: 790-801
- Burak S, Gehrt A (2010): Verkürzte Analysezeit bei höherer Genauigkeit. *Wiener klinisches Magazin* 13: 22-26

Burkholder K, Thompson K, Einstein M, Applegate T, Patterson J (2008): Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. Poultry Science 87: 1734-1741

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J-L, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X (2011): MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clinical biochemistry 44: 104-109

Cebra JJ (1999): Influences of microbiota on intestinal immune system development. American Journal of Clinical Nutrition 69: 1046s-1051s

Cheesman SE, Guillemin K (2007): We know you are in there: Conversing with the indigenous gut microbiota. Research in Microbiology 158: 2-9

Chung HC, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, Reading NC, Villablanca EJ, Wang S, Mora JR, Umesaki Y, Mathis D, Benoist C, Relman DA, Kasper DL (2012): Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. Cell 149: 1578-1593

Clavel T, Haller D (2007): Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. Current issues in intestinal microbiology 8: 25

Clench MH, Mathias JR (1995): The avian cecum - a review. Wilson Bulletin 107: 93-121

Corrier DE, Nisbet DJ, Scanlan CM, Hollister AG, Deloach JR (1995): Control of *Salmonella* Typhimurium colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria. Poultry Science 74: 916-924

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R (2009): Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science 326: 1694-1697

Craven S, Stern N, Cox N, Bailey J, Berrang M (1999): Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given Mucosal Starter Culture™. Avian Diseases: 484-490

- Crhanova M, Hradecka H, Faldynova M, Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2011): Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. *Infection and Immunity* 79: 2755-2763
- Czaran TL, Hoekstra RF, Pagie L (2002): Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 786-790
- Darai G, Sonntag H-G (2009): Resistenzentwicklung. In: Darai, D, Handermann, M, Sonntag, HG, Zöller, L (Hrsg.): *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*, pp 703-706. Springer, Heidelberg.
- De Kwaadsteniet M, Todorov S, Knoetze H, Dicks L (2005): Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 105: 433-444
- Deplancke B, Gaskins HR (2001): Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 1131s-1141s
- De Vuyst L, Moreno MF, Revets H (2003): Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 84: 299-318
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R (2010): Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 11971-11975
- Drasar BS, Barrow P (1985): *Intestinal microbiology*, University of Wisconsin - Madison.: American Society for Microbiology.
- Dullweber A (2010): Untersuchung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Geflügelmastbeständen, Dissertationsschrift, Hannover: Tierärztliche Hochschule,

- Eaton TJ, Gasson MJ (2001): Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1628-1635
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005): Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635-1638
- Eutamene H, Bueno L (2007): Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress. *Gut* 56: 1495-1497
- Favier CF, de Vos WM, Akkermans ADL (2003): Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* 9: 219-229
- Feuerpfeil I, Lopez-Pila J, Schmidt R, Schneider E, Szewzyk R (1999): Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 42: 37-50
- Fenselau C, Demirev PA (2001): Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 20: 157-171
- Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Galvez A (2007): Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews* 31: 293-310
- Franz CM, Huch M, Holzapfel WH (2009): Aufbau und Funktion der intestinalen Mikrobiota des Menschen. In: Bischoff, S.C. (Hrsg.): *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika*. Thieme, Stuttgart.
- Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Galvez A (2011): Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology* 151: 125-140
- Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Galvez A (2007): Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews* 31: 293-310
- Freiwald A, Sauer S (2009): Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols* 4: 732-742

- Fryklund B, Tullus K, Berglund B, Burman LG (1992): Importance of the environment and the fecal flora of infants, nursing staff and parents as sources of gram-negative bacteria colonizing newborns in 3 neonatal wards. *Infection* 20: 253-257
- Fuller R (1973): Differences in microfloras of intestine and bursa of fabricius as illustrated by coliform-lactobacillus ratio in 2 sites. *British Poultry Science* 14: 221-224
- Fuller R (1978): Epithelial attachment and other factors controlling the colonization of the intestine of the gnotobiotic chicken by lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 45: 389-395
- Fuller R (1984): Microbial activity in the alimentary-tract of birds. *Proceedings of the Nutrition Society* 43: 55-&
- Fuller R (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378
- Gabriel I, Lessire M, Mallet S, Guillot JF (2006): Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *Worlds Poultry Science Journal* 62: 499-511
- Gareis M (2006): Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1: 354-363
- Gassner G (1918): Ein neuer Dreifarbenährboden zur Typhus-Ruhr-Diagnose. *Zentralblatt für Bakteriologie* 80: 219-222
- Gedek B (1991): Regulierung der Darmflora über die Nahrung. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*: 277-301
- Gerlach H (1994): Funktion und Entwicklung der autochthonen Darmflora beim Wirtschaftsgeflügel. *Tierärztliche Praxis* 22: 141-145
- Gong JH, Forster RJ, Yu H, Chambers JR, Sabour PM, Wheatcroft R, Chen S (2002): Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiology Letters* 208: 1-7

- Goren E, Dejong WA, Doornenbal P, Bolder NM, Mulder RWA, Jansen A (1988): Reduction of *Salmonella* infection of broilers by spray application of intestinal microflora - a longitudinal-study. *Veterinary Quarterly* 10: 249-255
- Gorkiewicz G, Thallinger GG, Trajanoski S, Lackner S, Stocker G, Hinterleitner T, Gully C, Hogenauer C (2013): Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. *Plos One* 8
- Green G, Dicks L, Bruggeman G, Vandamme E, Chikindas M (1997): Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of Applied Microbiology* 83: 127-132
- Grönlund MM, Salminen S, Mykkänen H, Kero P, Lehtonen OP (1999): Development of intestinal bacterial enzymes in infants-relationship to mode of delivery and type of feeding. *APMIS Journal* 107: 655-660
- Hafez, HM (2003): Krankheitsbekämpfung und Arzneimitteleinsatz in Nutzgeflügelbeständen. *Tierärztliche Umschau* 58: 405-408
- Hafez M (2012): Gesundheits- und Hygienestrategien in der Geflügelhaltung als Grundlage der Lebensmittelsicherheit. In: Tagungsband Zoonosen und Lebensmittelsicherheit, BfR-Symposium 13./14. November 2012.
- Hakkinen M, Schneitz C (1996): Efficacy of a commercial competitive exclusion product against a chicken pathogenic *Escherichia coli* and *E coli* O157: H7. *The Veterinary Record* 139: 139-141
- Haller D, Bode C, Hammes WP (1999): Cytokine secretion by stimulated monocytes depends on the growth phase and heat treatment of bacteria. *Microbiology and Immunology* 43: 925-935
- Hamilton-Miller J, Shah S (1998): Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology* 27: 121-121
- Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW (2000): Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 30: 61-67

Hartemink R, Domenech VR, Rombouts FM (1997): LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods* 29: 77-84

Hartemink R, Rombouts FM (1999): Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 36: 181-192

Hartmann A (2005): Horizontaler Gentransfer - ein natürlicher Prozess. *Mensch und Umwelt Spezial* 17: 59-64

Hausleitner MM (2011): Hygienemanagement einer Mastkükenbrüterei als Basis für die Optimierung der Kükengesundheit unter mikrobiologischen Gesichtspunkten. Dissertationsschrift Ludwig-Maximilians-Universität München.

Heine W, Uhlemann M, Mohr C (1998): Physiologische Besiedlung des Darmtrakts in der Kindheit, ihre pathologischen Abweichungen und Beeinflussung durch die Nahrung. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 146: S7-S12

Heider G, Monreal G (1992): Diseases of poultry. Volume 2: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Herich R, Kokincakova T, Laukova A, Levkutova M (2010): Effect of preventive application of *Enterococcus faecium* EF55 on intestinal mucosa during salmonellosis in chickens. *Czech Journal of Animal Science* 55: 42-47

Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010): Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* 8: 15-25

Higashide T, Takahashi M, Kobayashi A, Ohkubo S, Sakurai M, Shirao Y, Tamura T, Sugiyama K (2005): Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1475-1476

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific dna-sequences. *Bio-Technology* 10: 413-417

Hinton A, Buhr RJ, Ingram KD (2000): Reduction of *Salmonella* in the crop of broiler chickens subjected to feed withdrawal. *Poultry Science* 79: 1566-1570

- Hölzel C (2006): Antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene in Schweinegülle. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hofacre CL, Johnson AC, Kelly BJ, Froyman R (2002): Effect of a commercial competitive exclusion culture on reduction of colonization of an antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* in day-old broiler chickens. *Avian Diseases* 46: 198-202
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ (1998): Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41: 85-101
- Hooper LV, Gordon JI (2001): Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118
- Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI (1999): A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 9833-9838
- Hörmansdorfer S, Gareis M, Bauer J, Mayr A (1995): Zum Nachweis der Shiga-like Toxine von *Escherichia coli* mit Hilfe des MTT-Zellkulturtests. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 201: 293-297
- Human Microbiome Project Consortium (2012): Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486: 207-214.
- Hume ME, Kubena LF, Edrington TS, Donskey CJ, Moore RW, Ricke SC, Nisbet DJ (2003): Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Poultry Science* 82: 1100-1107
- Humphrey TJ, Chart H, Baskerville A, Rowe B (1991): The Influence of Age on the Response of Spf Hens to Infection with *Salmonella*-Enteritidis Pt4. *Epidemiology and Infection* 106: 33-43
- Impey C, Mead G, George S (1984): Evaluation of treatment with defined and undefined mixtures of gut microorganisms for preventing *Salmonella* colonization in chicks and turkey poults. *Food Microbiology* 1: 143-147

- Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjolund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L (2010): Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *Plos One* 5
- Jarchum I, Pamer EG (2011): Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. *Current Opinion in Immunology* 23: 353-360
- Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK (2007): Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal* 1: 56-66
- Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK (2010): Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 156: 3216-3223
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS (1994): Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 462-478
- Jimenez E, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernandez L, Rodriguez JM (2008): Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* 159: 187-193
- Jung A, Rautenschlein S (2014): Comprehensive report of an *Enterococcus cecorum* infection in a broiler flock in Northern Germany. *BMC Veterinary Research* 10
- Kandler O (1983): Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224
- Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE (2006): Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 156-161
- Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F (1985): Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet-laser desorption mass-spectrometry of organic-molecules. *Analytical Chemistry* 57: 2935-2939
- Kassen R, Rainey PB (2004): The ecology and genetics of microbial diversity. *Annual Review of Microbiology* 58: 207-231

- Kawamoto S, Shima J, Sato R, Eguchi T, Ohmomo S, Shibato J, Horikoshi N, Takeshita K, Sameshima T (2002): Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3830-3840
- Keller L, Surette MG (2006): Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 4: 249-258
- Kerr B, Riley MA, Feldman MW, Bohannan BJM (2002): Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* 418: 171-174
- Klare I, Witte W (1997): Glycopeptide-resistant enterococci - Origin, spread, transferable resistance and significance. *Wiener Klinische Wochenschrift* 109: 293-300
- Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G (2012): Vancomycin-resistant enterococci (VRE). Recent results and trends in development of antibiotic resistance. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 55: 1387-1400
- Klein G (2003): Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* 88: 123-131
- Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 41: 103-125
- Ko S-H, Ahn C (2000): Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi. *Food Science and Biotechnology* 9: 263-269
- Korthals M, Ege MJ, Tebbe CC, von Mutius E, Bauer J (2008): Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust. *Journal of Microbiological Methods* 73: 49-56
- Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL (1989): Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 13: 109-116

Krüger M, Seidler T (2007): Allgemeine Bakteriologie. In: Mayr, A., Rolle, M. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart.

Kubena LF, Bailey RH, Byrd JA, Young CR, Corrier DE, Stanker LH, Rottinghaus GE (2001): Cecal volatile fatty acids and broiler chick susceptibility to *Salmonella* Typhimurium colonization as affected by aflatoxins and T-2 toxin. Poultry Science 80: 411-417

Kussaibati R, Guillaume J, Leclercq B, Lafont JP (1982): Effects of the intestinal microflora and added bile-salts on the metabolizable energy and digestibility of saturated fats in the chicken. Archiv für Geflügelkunde 46: 42-46

Lahuerta A, Westrell T, Takkinen J, Boelaert F, Rizzi V, Helwigh B, Borck Høg B, Korsgaard H, Ammon A, Mäkelä P (2011): Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009. Eurosurveillance (Online Edition) 16: 5-8

Lan Y, Verstegen MWA, Tamminga S, Williams BA (2005): The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. Worlds Poultry Science Journal 61: 95-104

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U (2013): Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. Applied and Environmental Microbiology 79: 4815-4820

Lee A, Gemmell E (1972): Changes in the mouse intestinal microflora during weaning: role of volatile fatty acids. Infection and Immunity 5: 1-7

Lee DH, Zo YG, Kim SJ (1996): Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. Applied and Environmental Microbiology 62: 3112-3120

Lev M, Briggs C (1956): The gut flora of the chick. I. The flora of newly hatched chicks. Journal of Applied Bacteriology 19: 36-38

Liebler-Tenorio EM, Pabst R (2006): MALT structure and function in farm animals. Veterinary Research 37: 257-280

- Lillehoj HS, Trout JM (1996): Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 349-360
- Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB (2012): In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences U S A* 109: 1691-1696
- Lu JR, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD (2003): Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6816-6824
- Madej JP, Chrzastek K, Piasecki T, Wieliczko A (2013): New insight into the structure, development, functions and popular disorders of bursa fabricii. *Anatomia Histologia Embryologia* 42: 321-331
- Maldonado NC, de Ruiz CS, Otero MC, Sesma F, Nader-Macias ME (2012): Lactic acid bacteria isolated from young calves - Characterization and potential as probiotics. *Research in Veterinary Science* 92: 342-349
- Marothi Y, Agnihotri H, Dubey D (2005): Enterococcal resistance-an overview. *Indian Journal of Medical Microbiology* 23: 214
- Mayr A (2007): Grundlagen der Allgemeinen Medizinischen Mikrobiologie. In: Mayr, A., Rolle, M. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart.
- Mead GC, Adams BW (1975): Some observations on cecal microflora of chick during first 2 weeks of life. *British Poultry Science* 16: 169-176
- Meng W, Partala E, Bernhardt H, Knoke M (1984): [Intestinal flora under the conditions of stress.] *Die Nahrung* 28: 615
- Messi P, Bondi M, Sabia C, Battini R, Manicardi G (2001): Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology* 64: 193-198

Methner U (2000): „Competitive Exclusion“ – ein Verfahren zur Prophylaxe der *Salmonella*-Infektion beim Geflügel. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 107: 402-408

Methner U (2001): *Salmonella* control in poultry meat and egg production. Fleischwirtschaft 81: 85-88

Methner U, Barrow PA, Berndt A, Steinbach G (1999): Combination of vaccination and competitive exclusion to prevent *Salmonella* colonization in chickens: experimental studies. International Journal of Food Microbiology 49: 35-42

Methner U, Barrow PA, Martin G, Meyer H (1997): Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonisation in newly hatched SPF chickens using live, attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. International Journal of Food Microbiology 35: 223-230

Miller CP, Bohnhoff M, Rifkind D (1957): The effect of an antibiotic on the susceptibility of the mouse's intestinal tract to *Salmonella* infection. Transactions of the American Clinical and Climatological Association 68: 51

Milner KC, Shaffer MF (1952): Bacteriologic studies of experimental *Salmonella* infections in chicks. Journal of Infectious Diseases 90: 81-96

Modi SR, Collins JJ, Relman DA (2014): Antibiotics and the gut microbiota. Journal of Clinical Investigation 124: 4212-4218

Moellering RC (1991): The *Enterococcus* - a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 28: 1-12

Moore W, Cato EP, Holdeman LV (1969): Anaerobic bacteria of the gastrointestinal flora and their occurrence in clinical infections. The Journal of Infectious diseases: 641-649

Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. Journal of Immunological Methods 65: 55-63

- Nader-Macias MEF, Otero MC, Espeche MC, Maldonado NC (2008): Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35: 1387-1395
- Nava G, Bielke L, Callaway T, Castaneda M (2005): Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Animal Health Research Reviews* 6: 105-118
- Ni X, Gong J, Yu H, Zeng D, Sharif S, Zhou X (2008): The bacterial community and diversity in the layer gastrointestinal tract: from crop to cecum analyzed by PCR-DGGE. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences* 7: 19
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000): Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 548
- Nocker A, Burr M, Camper AK (2007): Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology* 54: 276-289
- Noy Y, Geyra A, Sklan D (2001): The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch poult. *Poultry Science* 80: 912-919
- Nurmi E, Rantala M (1973): New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241: 210-211
- O'Hara AM, Shanahan F (2006): The gut flora as a forgotten organ. *Embo Reports* 7: 688-693
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA (1986): Microbial ecology and evolution - a ribosomal-RNA approach. *Annual Review of Microbiology* 40: 337-365
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel-electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2766-2770
- Ouwehand AC, Vesterlund S (2004): Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Science and Technology-New York* 139: 375-396

- Pantev A, Valcheva R, Danova S, Ivanova I, Minkov I, Haertle T, Chobert JM (2003): Effect of enterococcin A 2000 on biological and synthetic phospholipid membranes. *International Journal of Food Microbiology* 80: 145-152
- Parsons C, Potter L, Brown R (1983): Effects of dietary carbohydrate and of intestinal microflora on excretion of endogenous amino acids by poultry. *Poultry Science* 62: 483-489
- Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H, Klein G, Ellerbroek U (2003): Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 88: 311-314
- Pivnick H, Nurmi E (1982): Nurmi concept and its role in the control of *Salmonellae* in poultry. *Developments in food microbiology*
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004): Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229-241
- Rantala M (1974): Cultivation of a bacterial-flora able to prevent colonization of *salmonella-infantis* in intestines of broiler chickens, and its use. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B-Microbiology B* 82: 75-80
- Rantala M, Nurmi E (1973): Prevention of growth of *Salmonella-Infantis* in chicks by flora of alimentary-tract of chickens. *British Poultry Science* 14: 627-630
- Rehman HU, Vahjen W, Awad WA, Zentek J (2007): Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition* 61: 319-335
- Reichenbach T, Mobilia M, Frey E (2007): Mobility promotes and jeopardizes biodiversity in rock-paper-scissors games. *Nature* 448: 1046-1049
- Reidl S (2009): Funktionale Charakterisierung an der Biofilmbildung beteiligter Faktoren pathogener und kommensaler *Escherichia coli*. Dissertationsschrift, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Reuter G (1992): Culture Media for Enterococci and Group D-Streptococci. *International Journal of Food Microbiology* 17: 101-111

- Rhee K-J, Sethupathi P, Driks A, Lanning DK, Knight KL (2004): Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *The Journal of Immunology* 172: 1118-1124
- Richards JD, Gong J, de Lange CFM (2005): The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Canadian Journal of Animal Science* 85: 421-435
- Richter A, Hafez HM, Böttner A, Gangl A, Hartmann K, Kaske M, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G (2009): Verabreichung von Antibiotika in Geflügelbeständen. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 37: 321-329
- Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, MullerLoennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, DiPadova F, Kusumoto S, Schumann RR (1996): Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Pathology of Septic Shock* 216: 39-81
- Salanitro JP, Fairchild IG, Zgornick YD (1974): Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from chicken cecum. *Applied Microbiology* 27: 678-687
- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T (1998): Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology* 44: 93-106
- Samli HE, Senkoylu N, Koc F, Kanter M, Agma A (2007): Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition* 61: 42
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA (2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65: 725-759
- Savage D (1979): Introduction to mechanisms of association of indigenous microbes. *The American Journal of Clinical Nutrition* 32: 113-118

Savage DC (1977): Microbial ecology of gastrointestinal-tract. Annual Review of Microbiology 31: 107-133

Savage DC (1987): Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. Food Technology 41: 82-87

Schaedler W, Dubos R, Costello R (1965): Development of bacterial flora in gastrointestinal tract of mice. Journal of Experimental Medicine 122: 59

Scherz G (2013): Verschleppung subtherapeutischer antibakterieller Konzentrationen von Enrofloxacin und ihr Einfluss auf die Resistenzentwicklung kommensaler *Escherichia coli* im Darm beim Huhn. Dissertationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Schillinger U, Lucke FK (1989): Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology 55: 1901-1906

Schneitz C (2005): Competitive exclusion in poultry - 30 years of research. Food Control 16: 657-667

Schneitz C, Kiiskinen T, Toivonen V, Nasi M (1998): Effect of Broilact on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. Poultry Science 77: 426-432

Schulze J, Sonnenborn U, Ölschläger T (2008): Probiotika: Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Schwaiger K, Bauer J, Holzel CS (2013): Selection and persistence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* including extended-spectrum beta-lactamase producers in different poultry flocks on one chicken farm. Microbial Drug Resistance 19: 498-506

Schwaiger K, Harms KS, Bischoff M, Preikschat P, Molle G, Bauer-Unkauf I, Lindorfer S, Thalhammer S, Bauer J, Holzel CS (2014): Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans - is there a link to antimicrobial resistance? Frontiers in Microbiology 5

Schwaiger K, Huther S, Holzel C, Kampf P, Bauer J (2012): Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat

purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *International Journal of Food Microbiology* 154: 206-211

Schwarz S, Chaslus-Dancla E (2001): Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* 32: 201-225

Schwieger F, Tebbe CC (1998): A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4870-4876

Sekelja M, Rud I, Knutsen SH, Denstadli V, Westereng B, Naes T, Rudi K (2012): Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 2941-2948

Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P (2010): *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49: 543-551

Sengupta R, Altermann E, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Roy NC (2013): The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*: Article ID: 237921

Shanahan F (2002): The host-microbe interface within the gut. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology* 16: 915-931

Shapiro SK, Sarles WB (1949): Microorganisms in the Intestinal Tract of Normal Chickens. *Journal of Bacteriology* 58: 531-544

Sharma JM (1991): Overview of the Avian Immune-System. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 30: 13-17

Silva M, Jacobus N, Deneke C, Gorbach S (1987): Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31: 1231-1233

- Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI (2000): Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4705-4714
- Sjolund M, Wreiber K, Andersson DI, Blaser MJ, Engstrand L (2003): Long-term persistence of resistant enterococcus species after antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*. *Annals of Internal Medicine* 139: 483-487
- Sklan D (2001): Development of the digestive tract of poultry. *Worlds Poultry Science Journal* 57: 415-428
- Smith HW (1965): Development of flora of alimentary tract in young animals. *Journal of Pathology and Bacteriology* 90: 495
- Smits CH, Annison G (1996): Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition—towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poultry Science Journal* 52: 203-221
- Snoeyenbos G, Weinack OM, Smyser C (1978): Protecting chicks and poults from salmonellae by oral administration of "normal" gut microflora. *Avian Diseases* 22: 273-287
- Soerjadi A, Rufner R, Snoeyenbos G, Weinack OM (1982): Adherence of salmonellae and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks. *Avian Diseases* 26: 576-584
- Soerjadi AS, Stehman SM, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF (1981): Some measurements of protection against para-typhoid *Salmonella* and *Escherichia-coli* by competitive-exclusion in chickens. *Avian Diseases* 25: 706-712
- Soerjadi-Liem A, Snoeyenbos G, Weinack O (1984): Establishment and competitive exclusion of *Yersinia enterocolitica* in the gut of monoxenic and holoxenic chicks. *Avian Diseases* 28: 256-260
- Stanley D, Geier MS, Hughes RJ, Denman SE, Moore RJ (2013): Highly Variable Microbiota Development in the Chicken Gastrointestinal Tract. *Plos One* 8

Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ (2014): Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 4301-4310

Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Kamiya S (2004): The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 41: 219-226

Thompson CL, Wang B, Holmes AJ (2008): The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME Journal* 2: 739-748

Tomasz A (1994): Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria - a report on the rockefeller-university workshop. *New England Journal of Medicine* 330: 1247-1251

Torres AG, Vazquez-Juarez RC, Tutt CB, Garcia-Gallegos JG (2005): Pathoadaptive mutation that mediates adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. *Infection and Immunity* 73: 4766-4776

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI (2009): A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480-U487

Üffing B (2012): Einfluss der Mischfutterherstellung (Art der Vermahlung/Konfektionierung) auf ausgewählte Keimgruppen der Gastrointestinalflora von Masthähnchen. Dissertationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Uni Z, Ganot S, Sklan D (1998): Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science* 77: 75-82

Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, Dorrestein PC, Turnbaugh PJ, Knight R (2014): The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology* 146: 1470-1476

Vahjen W, Jadamus A, Simon O (2002): Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing

turkey poult. Archives of Animal Nutrition - Archiv Für Tierernährung 56: 419-429

Valentin-Weigand P (2010): Virulenzmechanismen und -faktoren. In: Selbitz, H.-J., Truyen, U. und Valentin-Weigand, P. (Hrsg.): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

van der Wielen PW, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BA, van Knapen F (2000): Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. Applied and Environmental Microbiology 66: 2536-2540

van der Wielen PWJJ, Keuzenkamp DA, Lipman LJA, van Knapen F, Biesterveld S (2002): Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. Microbial Ecology 44: 286-293

VO 1831/2003: Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. Amtsblatt L 268: 29-43

Waters CM, Bassler BL (2005): Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology 21: 319-346

Watson J, Jones RC, Cortes C, Gerber SI, Golash RG, Price J, Bancroft E, Mascola L, Gorwitz RJ, Jernigan DB, James L, Cdc (2006): Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among healthy newborns - Chicago and Los Angeles County, 2004 (Reprinted from MMWR, vol 55, pg 329-332, 2006). Jama-Journal of the American Medical Association 296: 36-38

Weinack OM, Snoeyenbos GH, Smyser CF, Soerjadi AS (1982): Reciprocal competitive-exclusion of *Salmonella* and *Escherichia-coli* by native intestinal microflora of the chicken and turkey. Avian Diseases 26: 585-595

Welker M, Moore ER (2011): Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Systematic and Applied Microbiology 34: 2-11

- Welker M (2012): MALDI-TOF MS for identification of microorganisms: a new era in clinical microbiological research and diagnosis. *The Role of New Technologies in Medical Microbiological Research and Diagnosis*: 56
- WHO (2014): Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (letzter Zugriff 2015-03-20).
- Wieser A, Schneider L, Jung JT, Schubert S (2012): MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 965-974
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic-markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535
- Wintzingerode Fv, Göbel UB, Stackebrandt E (1997): Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 213-229
- Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ (2003): Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science* 82: 1030-1036
- Yegani M, Korver DR (2008): Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science* 87: 2052-2063
- Yim G, Wang HHM, Davies J (2006): The truth about antibiotics. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 163-170
- Yin YS, Lei F, Zhu LY, Li SJ, Wu ZW, Zhang RF, Gao GF, Zhu BL, Wang X (2010): Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME Journal* 4: 367-376
- Zhao LL, Wang G, Siegel P, He C, Wang HZ, Zhao WJ, Zhai ZX, Tian FW, Zhao JX, Zhang H, Sun ZK, Chen W, Zhang Y, Meng H (2013): Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. *Scientific Reports* 3 (<http://hdl.handle.net/10919/48939>, letzter Zugriff 2015-03-20).
- Zhao S, White DG, Friedman SL, Glenn A, Blickenstaff K, Ayers SL, Abbott JW, Hall-Robinson E, McDermott PF (2008): Antimicrobial resistance in *Salmonella*

enterica Serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6656-6662

Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM (1998): Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3854-3859

Zoetendal EG, Mackie RI (2005): Molecular methods in microbial ecology. In: Tannock, GW (Hrsg.): *Probiotics & prebiotics: scientific aspects*. Caister Academic Press, Wymondham, UK: 1-24

IX ANHANG

1 Erweiterte Ergebnisse

1.1 PCR-SSCP-Analyse

1.1.1 Tiere aus Volierenhaltung

Mikrobiom im Darminhalt

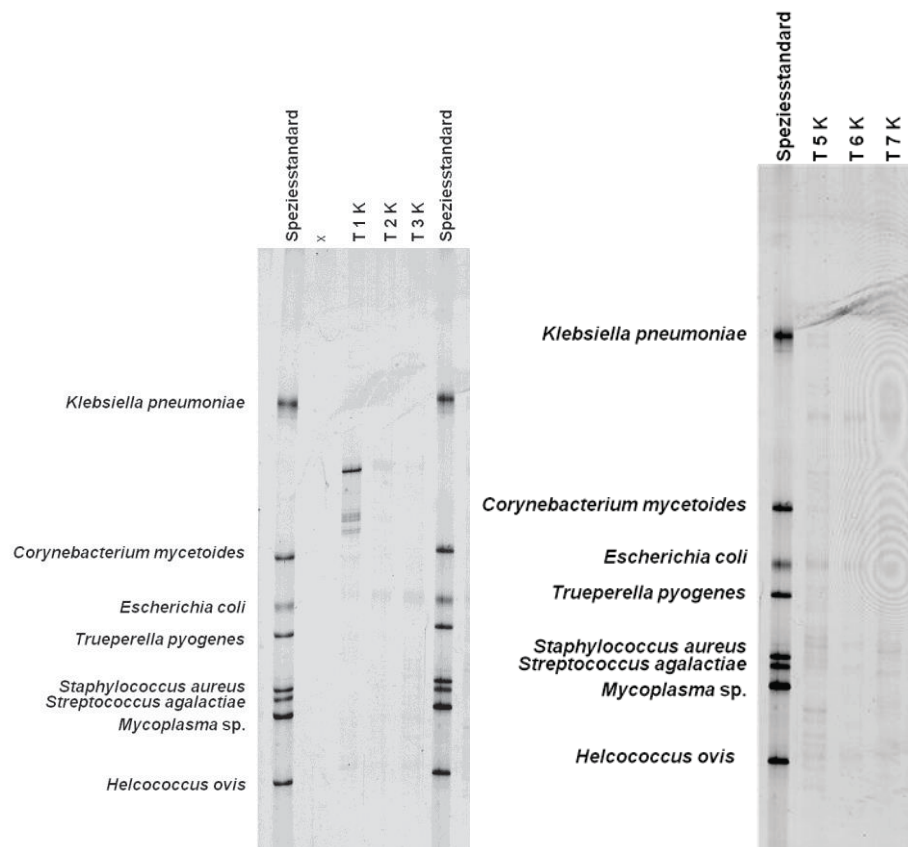


Abbildung 64: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 K–T 3 K) und 6 h (T 5 K–T 7 K)

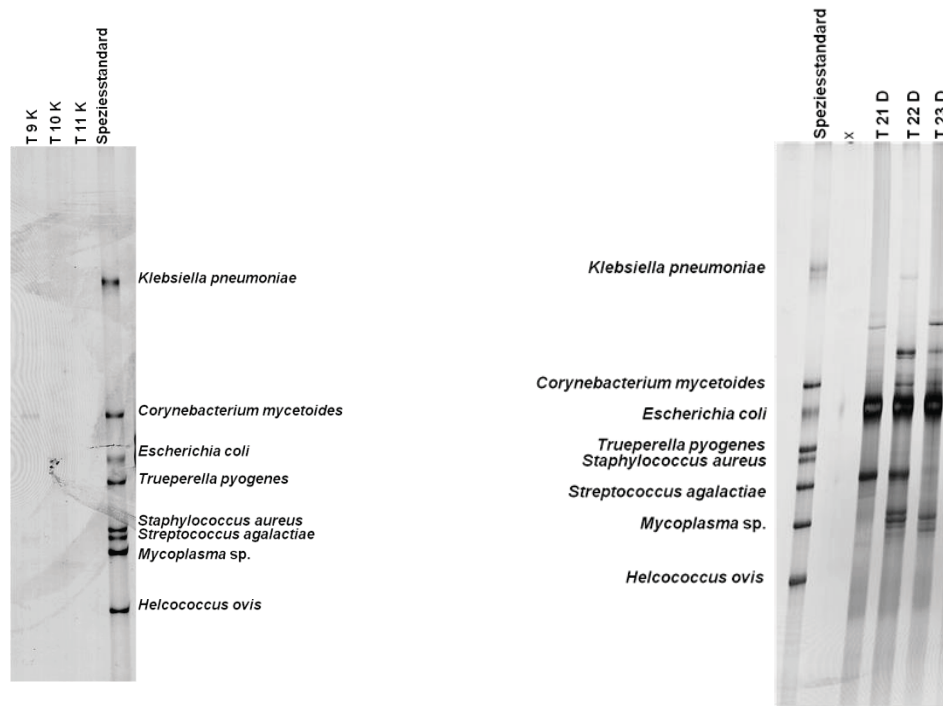


Abbildung 65: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Kühen aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 9 K-T 11 K) und 24 h (T 21 D-T 23 D)

Mukosa-assoziiertes Mikrobiom

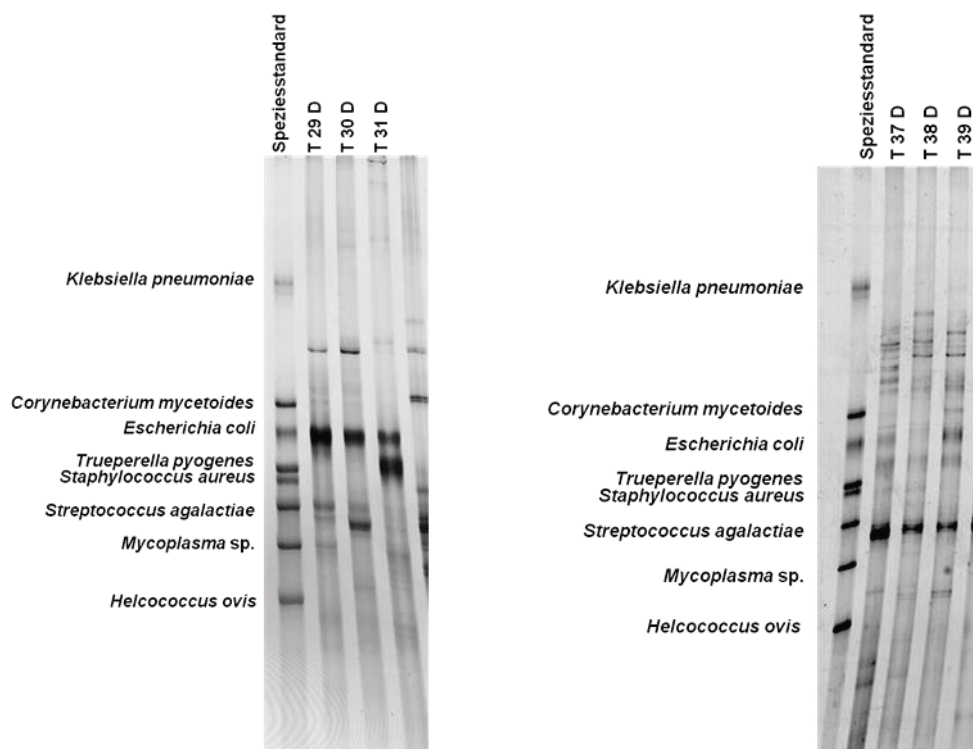


Abbildung 66: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Kühen aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 29 D-T 31 D) und 72 h (T 37 D-T 39 D)

1.1.2 Küken aus Käfighaltung

Mikrobiom im Darminhalt

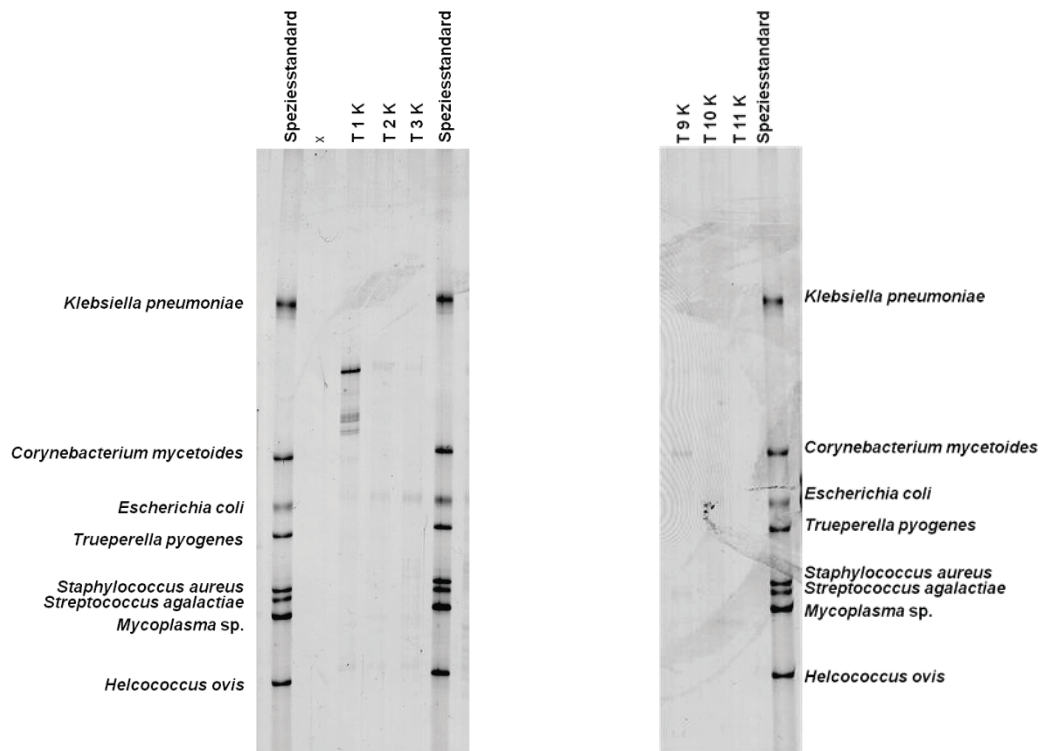


Abbildung 67: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 K-T 3 K) und 6 h (T 9 K-T 11 K)

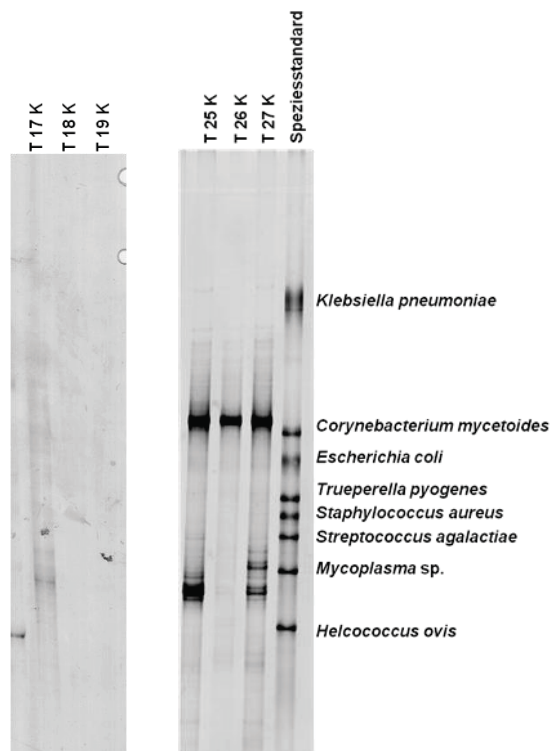


Abbildung 68: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 17 K-T 19 K) und 24 h (T 26 K-T 27 K)

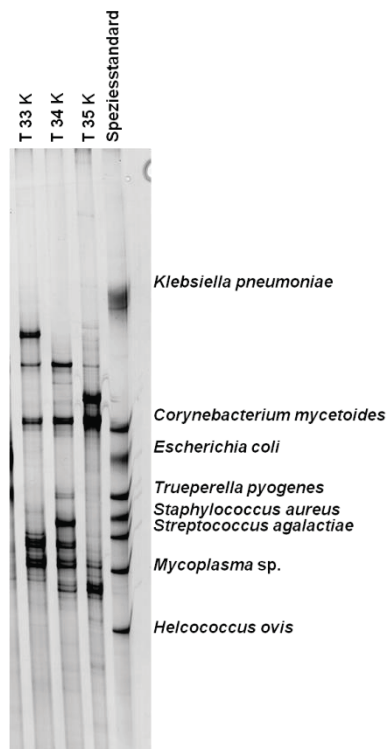


Abbildung 69: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 33 K-T 35 K)

Mukosa-assoziiertes Mikrobiom

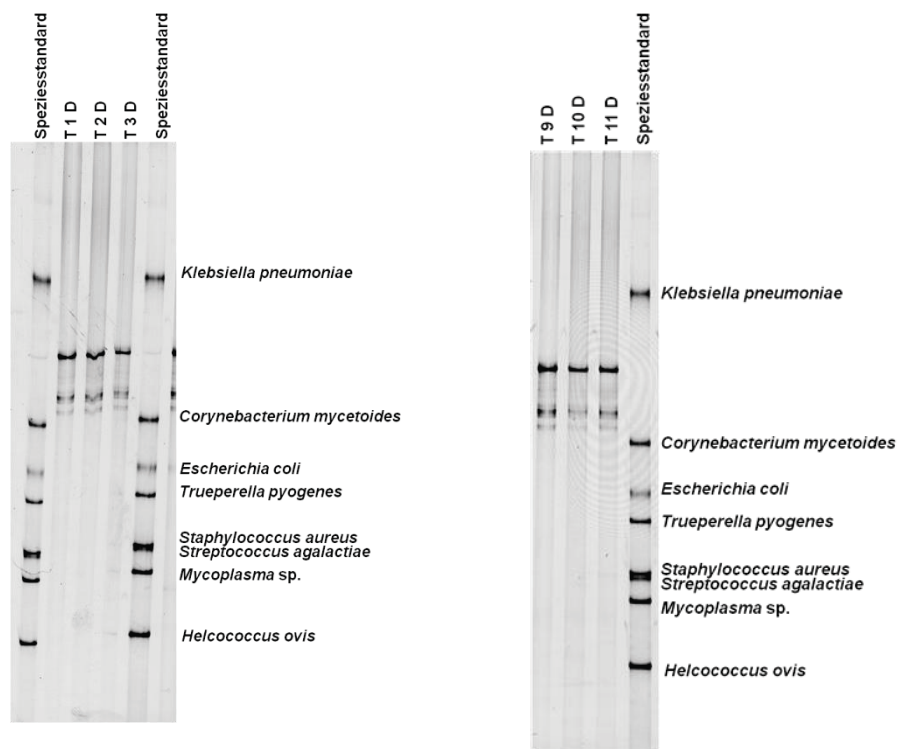


Abbildung 70: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 D-T 3 D) und 6 h (T 9 D-T 11 D)

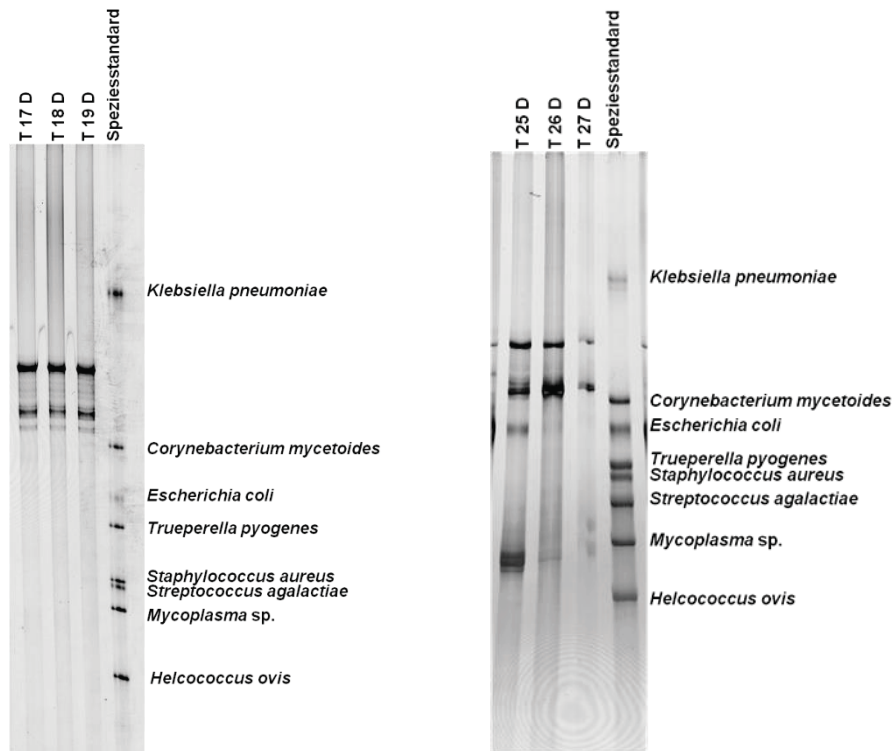


Abbildung 71: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Kühen aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 17 D-T 19 D) und 24 h (T 25 D-T 27 D)

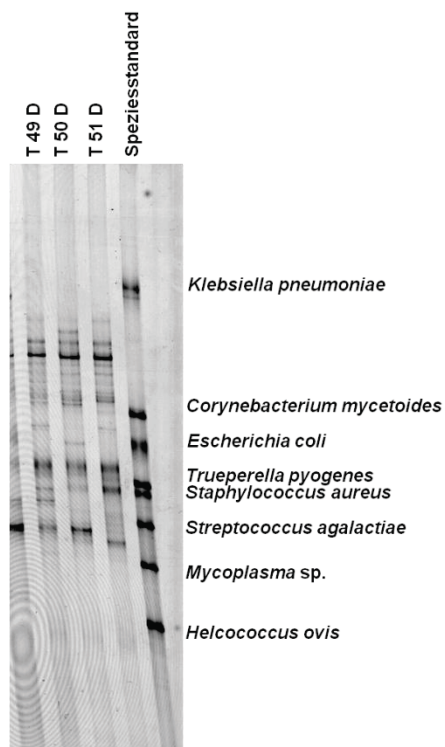


Abbildung 72: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Kühen aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 7 Tage (T 49 D-T 51 D)

1.1.3 Küken aus Maststallhaltung

Mikrobiom im Darminhalt

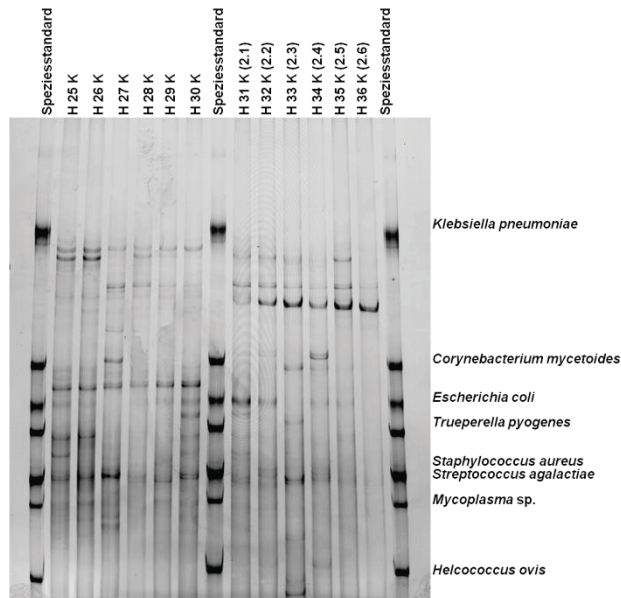


Abbildung 73: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 21 Tage Stallabteil 1 (H 25 K-H 30 K) und Stallabteil 2 (H 31 K-H 36 K)

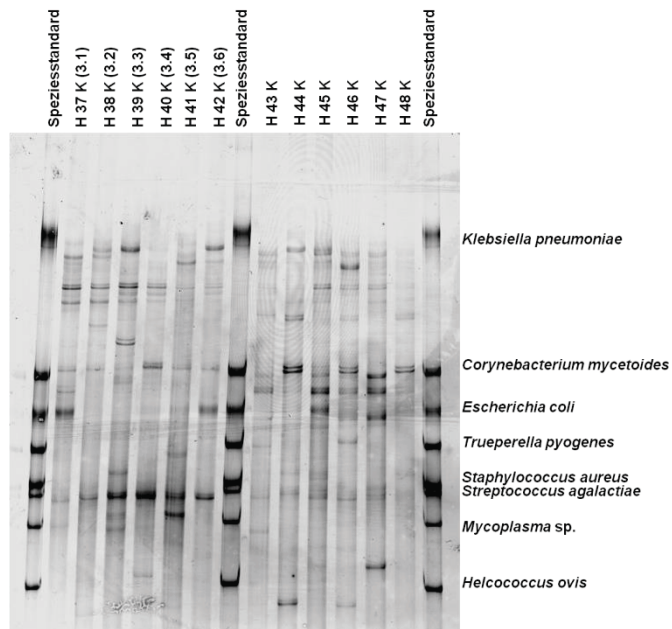


Abbildung 74: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 21 Tage (Stallabteil 3; H 37 K-H 42 K) und 35 Tage (Stallabteil 1; H 43 K-H 48 K) der Probennahme

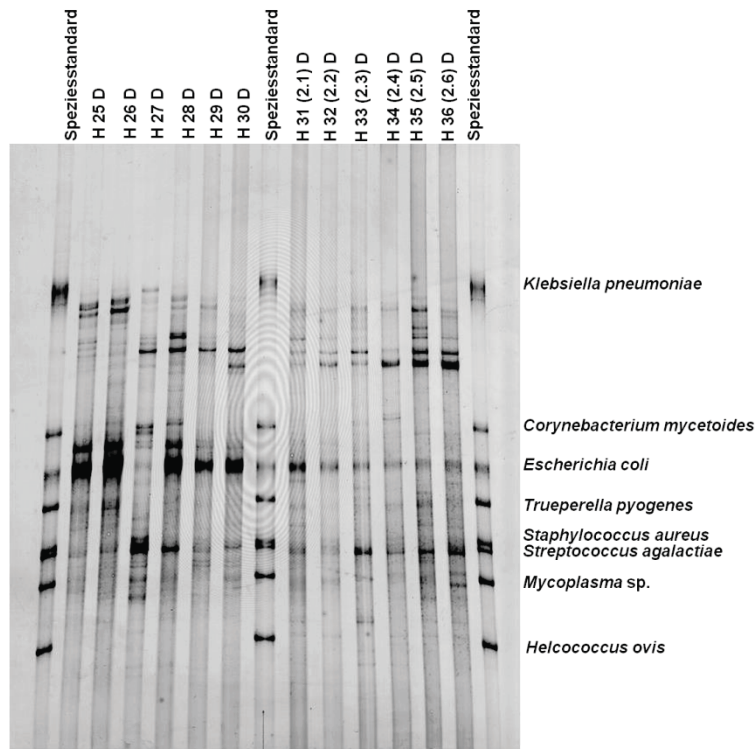


Abbildung 75: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Kühen aus Maststallhaltung aus Stallabteil 1 (H 25 D-H 30 D) und Stallabteil 2 (H 31 D-H 36 D) zum Zeitpunkt 21 Tage

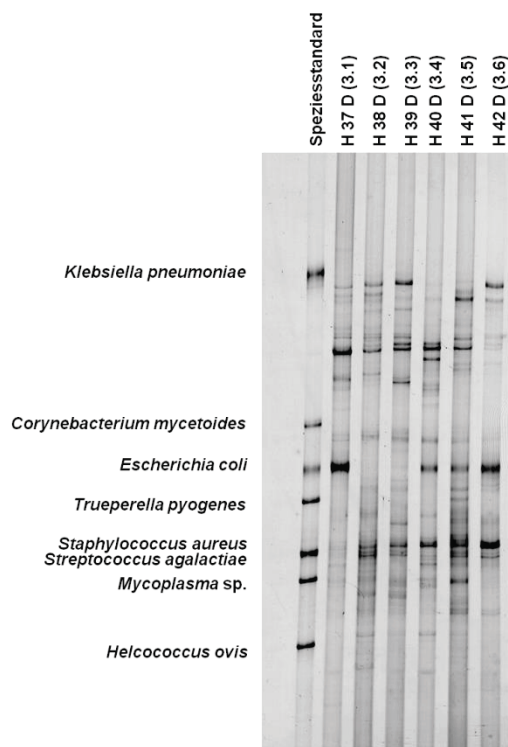


Abbildung 76: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Kühen aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 21 Tage (Stallabteil 3; H 37 D-H 42 D)

1.2 Sequenzierung

Tabelle 26: Zäkales Mikrobiom von Tieren aus Volierenhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse (Tag 7)

Probe	Bande Nr.	Sequenz (5' → 3')
T 45 K	1	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTACACRAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGG GAGCGCAGGCGGGTATGCAAGTTGGGAGTGAAATACATGGGCTCAACCCATGAACCTGC TCTCAAACTGTGTATCTTGTAGTAGTGCAGAGGTAGGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGT GGAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCCTACTGGGCACCAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACCGTAAACGATGATTACTAGGTGTTGGAGGATAGACCCCTTCAGTGCCGAGTTAAC ACAATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC GG
T 45 K	2	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GTGCGTAGGCGGGCTATAAGTACAGCGGTGAAATGTTCCGGCTCAACCGGGAACCTGC CGTTGAACTGTAGAGCTAGAGTCCACAAGAGGTATGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCATAGATATCACGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCATACTGGGGTGAAC AGACGCTGAAGCACGAAAGCGTGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAATACTAAGTGTTCGATATACAGTAAGCGGTACAGCGAAAGCG TTAAGTATCCACCTGGGGAGTACGCCGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
T 45 K	3	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATTCAAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GTGCGTAGGCGGGTTTGATAAGTTAGAGGTGAAATCCCGGGGCTTAACTCCGGAACCTGC CTCTAATACTGTTAGACTAGAGAGTAGTTGCGGTAGGCGGAATGTATGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGAKATCATACAGAACCCGATTGCGAAGGCAGCTTACCAAACCTATATC TGACGTTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCAGTAAACGATGATAACTCGTTGTCGGCGATACACAGTCGGTGACTAAGCGAAAGCG ATAAGTTATCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGG
T 45 K	4	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATTCAAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GTGCGTAGGCGGGTTTGATAAGTTAGAGGTGAAATCCCGGGGCTTAACTCCGGAACCTGC CTCTAATACTGTTAGACTAGAGAGTAGTTGCGGTAGGCGGAATGTATGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGAGATCATACAGAACCCGATTGCGAAGGCAGCTTACCAAACCTATATC TGACGTTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCAGTAAACGATGATAACTCGTTGTCGGCGATACACAGTCGGTGACTAAGCGAAAGCG ATAAGTTATCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGG
T 46 K	5	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGATGGATGTTTAAAGTCAGTTGTGAAAGTTGCGGCTCAACCGTAAAATTGC AGTTGATACTGGATGTCTTGTAGTGCAGTTGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAAGCTGCAAC TGACATTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACGGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCATATACGGCAAGCGGCAAGCGAAAGCG TTAAGTATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
T 47 K	6	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGATGCGAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GTGCGTAGGCGGAAGAATAAGTCAGCGGTGAAATGCTTCAGCTCAACTGGAGAATTGC CGATGAACTGTTTTTCTAGAGTATAAAAGAGGTATGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCATAGATATCACGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCATACTGGGCTATAAC TGACGCTGAAGCACGAAAGCGTGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAATACTAAGTGTTCGATATAATGTAAGCGGTACAGCGAAAGCG TTAAGTATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

Tabelle 27: Mukosa-assoziiertes Mikrobiom von Tieren aus Volierenhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse (Tag 7)

Probe	Bande Nr.	Sequenz (5' → 3')
T 45 D	7	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGG GAGCGTAGACGGCGAAGCAAGTCTGGTGTGAAACCCCGGGGCTCAACCTCGGGCCTGC ATTGGAAACTGTTTTGCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGCAAC TGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGCGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGCCGCAAAC GCATTAAGCATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGAC GG
T 45 D	8	CAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGG GAGCGTAGACGGATAGGCAAGTCTGGAGTGAAACCCCGGGGCTCAACCCCGGGACTGC TTTGGAAACTGTTTTATCTAGAGTGCTGGAGAGGTAAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAGTAAC TGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGCGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGACTACTAGGTGTCGGGTGGCAAAGCCATTTCGGTGCCGCAGCAAAC GCAATAAGTAGTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGAC GG
T 46 D	9	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGATGGATGTTTAAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGCGGCTCAACCGTAAAATTGC AGTTGATACTGGATGTCTTGAGTGCAAGTTGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAAGCCTGCTAAGCTGCCAC TGACATTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACGGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCATATACGGCAAGCGGCCAAGCGAAAGCG TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAACTCAAAGGAATTGACGG
T 46 D	10	CAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGCTGCAGTTAAAA GCTCGTAGTTGGATCTTGGGATCGAGCTGGCGGTCCGCCGCGAGGCGAGCTACCGCCT GTCCAGCCCTGTCTCTCGGCGCCCCCTCGATGCTCTTAACTGAGTGTCCCGCGGGG CCCGAAGCGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTGGCCGCGGGAATA CTCCAGCTAGGAATAATGGAATAGGACTCCGGTTCTATTTTGTGTGGTTTTTCGGAAACG GGGCATGATTAAGAGGGACGGCCGGGGGCATTTCGTATTGTCGCTAGAGGTGAAAT TCTTGGAACCGGCGCAAGACGAACTAAAGCGAAAGCATTTGCCAAGAATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAAGTCGAGGTTTCAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCCGACCAT AAACGATGCCGACTCGCGATCCGGCGGCGTTATTCCCATGACCCGCGGGCAGCTCCC GGGAAACCAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTCAAAG GAATTGACGG
T 47 D	11	CAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGG GAGCGTAGACGGATAGGCAAGTCTGRAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGACTGC TTTGGAAACTGTWKRTCTWGAGTGCTGGAGAGGTAAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAGTAAC TGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGCGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGACTGCTAGGTGTCGGGTGGCAAAGCCATTTCGGTGCCGCAGCTAAC GCAATAAGCAGTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGAC GG

Tabelle 28: Zäkales Mikrobiom von Tieren aus Maststallhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse

Probe	Bande Nr.	Sequenz 5' → 3'
H 20 K	1	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGGTGGATTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTGCGGCTCAACCGTAAAATTGC AGTTGAAACTGGCAGTCTTGAGTACAGTAGAGGTGGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAAGTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTAGACTGTTAC TGACACTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCA TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
H 22 K	2	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGGTGGACTGGTAAAGTCAGTTGTGAAAGTTGCGGCTCAACCGTAAAATTGC AGTTGATACTGTCACTCTTGAGTACAGTAGAGGTGGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAAGTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTGGACTGCAAC TGACACTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCA TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
H 24 K	3	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGGCGGACGCTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTGCGGCTCAACCGTAAAATTGC AGTTGATACTGGGTGTCTTGAGTACAGTAGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAAGTCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTGGACTGTAAC TGACGCTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCG TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
H 24 K	4	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGGCGGACGCTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTGCGGCTCAACCGTAAAATTGC AGTTGATACTGGGTGTCTTGAGTACAGTAGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAAGTCCGATTGCGAAGGCAGCTTCTGGACTGTAAC TGACGCTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCG TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG

Tabelle 29: Mukosa-assoziiertes Mikrobiom von Tieren aus Maststallhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse

Probe	Bande Nr.	Sequenz (5'→3')
H 19 D	5	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGGTGGACTGGTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGGCGCTCAACCGTAAAAATTGC AGTTGATACTGTCACTCTTGTAGTACAGTAGAGGTGGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTGGACTGCAAC TGACACTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGGCATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCA TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
H 20 D	6	CAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGG GAGCGTAGACGGATAGGCAAGTCTGGAGTGAAAGCCCGGGCTCAACCCSGGGACTGC TTTGGAACCTGTTTATCTAGAGTGTGGAGAGGTAAGTGAATTCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATAGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAGTAAC TGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAMTGCTAGGTGTSGGGKGGCWRASCCMTTCGGTGCCGCGAGCTAAC GCAATAAGCAKTCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGGATGAAACTCAAAGGAATTGAC GG
H 22 D	7	Keine Auswertung möglich
H 22 D	8	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC GCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGC ATCTGATACTGGCAAGCTTGTAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGCCCTGGACGAAGAC TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAAC GCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGAC GG
H 23 D	9	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGGTGGATTGTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGGCGCTCAACCGTAAAAATTGC AGTTGAAACTGGCAGTCTTGTAGTACAGTAGAGGTGGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAATCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTAGACTGTTAC TGACACTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGGCATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCA TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
H 24 D	10	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTATTTGGGTTTAAAGG GAGCGTAGGCGGACGCTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGGCGCTCAACCGTAAAAATTGC AGTTGATACTGGGTGTCTTGTAGTACAGTAGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGT GAAATGCTTAGATATCACGAAGAATCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTAGACTGTTAC TGACGCTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC ACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGGCATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAAGCG TTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
H 47 D	11	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGA GCGCGTAGGCGGGGTAGTAAGTCAGATGTGAAATCCTATGGCTTAACCATAGAAGTGC ATTTGAAACTACTACTCTAGAGTATGGGAGAGGTAGGTGGAATTCTTGGTGTAGGGGT AAAATCCGTAGAGATCAAGAGGAATACTCATTTGCGAAGGCGACCTGCTGGACATTAC TGACGCTGATGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAATGCTAGTTGTTGTGAGGCTTGTCTTGCAGTAATGCAGCTAAC GCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGAC GG

Tabelle 30: Mikrobiom der Kloake vom Schneehuhn: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse

Probe	Bande Nr.	Sequenz 5' → 3'
H 134 762	1	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA GCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGCATTAGTGACTGCATAGCTGGAGTACGGCAGAGGGGGATGGAATTCGCGTGT AGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCTTGG GCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGTCTTCACTGACTCAGTA ACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACT CAAAGGAATTGACGG
H 134 762	2	CAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAA GCGCGCGTAGGTGGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAA TTGCATTTCGATACTGGTTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGG CCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGT GGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAAC TCAAAGGAATTGACGG
H 174 162	3	GTCCAAGCKTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAG WCCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATGCATTGGAGACTGCACKGCTA GAGTGYGKCAGAGGGGGGTGAATTCACGTGTAGCRGTGAAATGCGTAGAKATGT GGAGGAAYACCRRTGSGGAAGGCAGYCCCCCTGGGWYAACACTGACGCTCAKGCACG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATG TCAACTAGGTGTTGGGG
D 102 553	4	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA GCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAG GGTCATTGGAACCTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTTTGG TCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAG TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA CTCAAAGGAATTGACGG
D 102 553	5	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGTGGTTGGTCGCGTCTGTCTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCTCCGGC TTGCGGTGGGTACGGGCTGACTGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGT AGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTCTTGG GCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCTGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGCTGTTGTGGTTTCTGC GCCGGAGCTAACGCGTTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGG
D 102 553	6	CAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAA GCGCGCGTAGGTGGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAA TTGCATTTCGATACTGGTTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGG CCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGT GGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAAC TCAAAGGAATTGACGG
D 102 553	7	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCTCCGGGT GTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGTAAGTGAATTCCTGGTG TAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTTACTG GGCAGTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGACTCCT GTGTCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGG
D 102 553	8	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCTCCGGGT GTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGTAAGTGAATTCCTGGTG TAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTTACTG GGCAGTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGACTCCT GTGTCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGG

Fortsetzung Tabelle 30

D 102 553	9	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA GCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAG GGTCATTGGAAGCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCGGCTCTCTGG TCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA CTCAAAGGAATTGACGG
D 247 791	10	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA GCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGTTTGTCTGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGGAA TTGCGATGAAGACTGCAAGGCTTGAATCTGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGT AGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGG GTCAAGATTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTAGTTGTCTGGGTTTAAATTAACCTTGGTA ACGCAGCTAACGCGTGAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACT CAAAGGAATTGACGG
D 247 791	11	CAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAA GCGCGCGTAGGTGGCCAAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAA TTGCATTTCGATACTGGTTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGG CCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGT GGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAC TCAAAGGAATTGACGG
D 247 792	12	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGTGGTTTGTCTCGCTCTGTGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTCCGGGT GTGACGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGTAACCTGGAATTCCTGGTG TAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTTACTG GGCAGTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCTGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGACTCCT GTGTCTGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGG
D 247 799	13	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA GCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAG GGTCATTGGAACTCGGGCAGACTTGAGTGCGAAGAGGAGTGAATTCATGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCGGCTCTCTGG TCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA CTCAAAGGAATTGACGG
D 247 800	15	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGCGGTTTGTCTCGCTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGGAT CTGCGGTGGAACTCGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGG GCATTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTC GCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGG
D 247 893	17	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA GCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGTTTGTCTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAA TTGCGATGAAGACTGCAAGGCTTGAATCTGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACGTTGT AGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGG GTCAAGATTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCCTAACGATGTCTACTAGTTGTCTGGGTTTAAATTAACCTGGTA ACGCAGCTAACGCGTGAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACT CAAAGGAATTGACGG
D 247 900	16	CAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAA GCGCGCGTAGGTGGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAA TTGCATTTCGATACTGGTTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGG CCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGT GGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAC TCAAAGGAATTGACGG
D 247 900	18	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGTGGTTTGTCTCGCTCTGTGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTCCGGGT GTGACGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGTAACCTGGAATTCCTGGTG TAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGCTACTG GGCAGTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCTGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGACTCCT GTGTCTGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGG

Fortsetzung Tabelle 30

D 247 900	22	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGATTTCATTGGGCGTAAA GCGCGCGTAGGCGGCCGCGCAGGCGGGGGTCAAATCCCGGGCTCAACCCCGGTC CGCCCCCGAACCGCGCGGCTTGGGTCCGGCAGGGGAGGGTGAACGCCCGGTGTA GCGGTGGAATGCGCAGATATCGGGCGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCTGGG CCGGCACCGACGCTGAGGCGCGAGAGCCGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCCGCGGTAAACGATGGACGCTAGGTGTGGGGACGCAGCAGTCTCCGTGC CGCAGCCAACGCATTAAGCGTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTC AAAGGAATTGACGG
D 247 900	23	CAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCAATAGCGTATATTAATGTTGTTGCCGTAAA AAGCTCGTAGTCGAACCTTCGGCCTCTGCCACCCGGTCCGCCTATTTGGGTGTGTAC TGGAGTGGTGGAGGCTTACCTCGTGGTGAACGGCCATGTCCTTTATTGGGTGTGGT CGGGAACCATGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCC CGAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGTGCGGTCTATTTTGTGGTGT CTAGGATCCGCGTAAATGATTAAATAGGAGATAGTTGGGGCATTCTGATATCAATTGTC AGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAG GATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAAGGTTAGGGGATCGAAAACGATCAGATACCGT TGTAAGTCTTAACAGTAAACGATGCCGACTAGGGATCGGATGAGGTTTTTAATGACT CATTCGGCACCTGAAGAGAAATCTTTAAGTCAGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCA AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
D 247 904	24	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGATTACTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGCTGCTCTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACTCCGGGT GTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTGTAGGGGTAAGTGAATTCCTGGTG TAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTTACTG GGCAGTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCTGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGACTCCT GTGTCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGG
D 247 906	19	Keine Auswertung möglich
D 247 907	20	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA GAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACYCCGGAT CTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGT AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCCTGG GCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCC GCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGACGG
D 243 923	21	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA GCGTGCGCAGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGCATTAGTGACTGCATAGCTGGAGTACGGCAGAGGGGATGGAATTCCTGGTGT AGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCTGG GCCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTGTGGGTCTTCACTGACTCAGTA ACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACT CAAAGGAATTGACGG

1.3 Keimkonkurrenz-Versuch 1

1.3.1 *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 versus *Salmonella* spp.

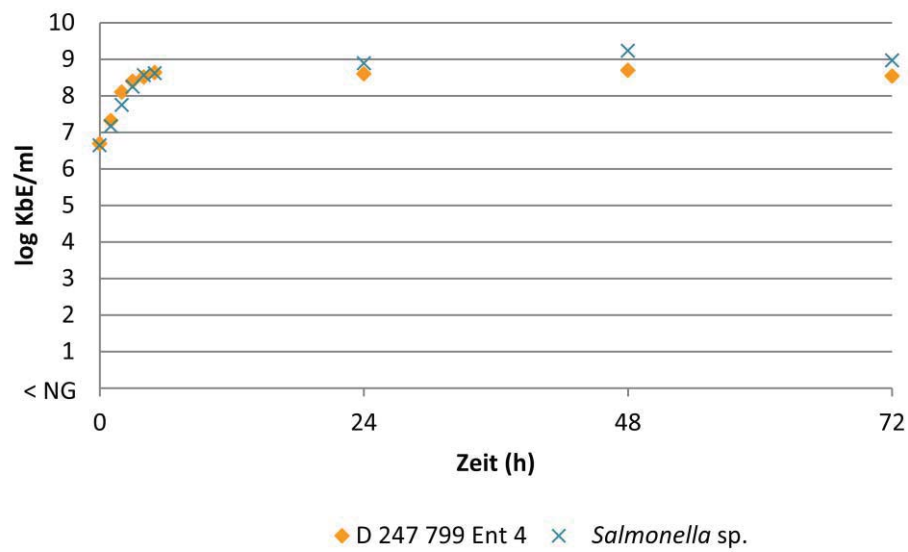


Abbildung 77: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 (Testkeim) und *Salmonella* spp. (Indikatorkeim) in Mischkultur (Inokulum Testkeim vs. Indikatorkeim 10^6+10^6 KbE/ml)

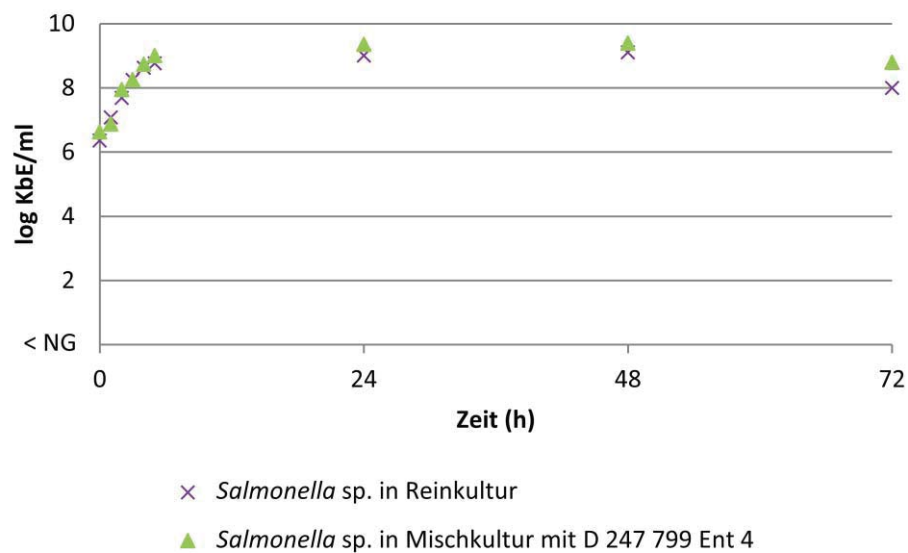


Abbildung 78: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 (10^6+10^6 KbE/ml)

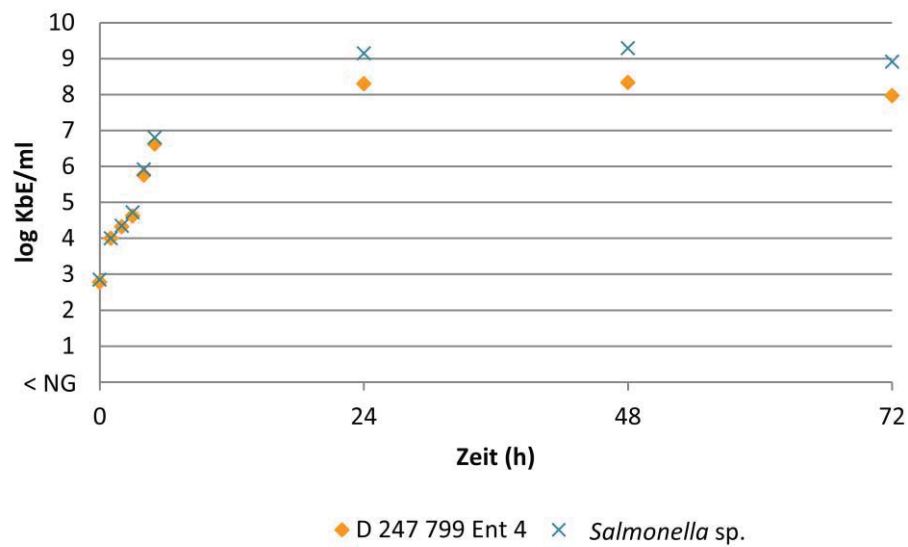


Abbildung 79: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 und *Salmonella* spp. in Mischkultur (10²+10² KbE/ml)

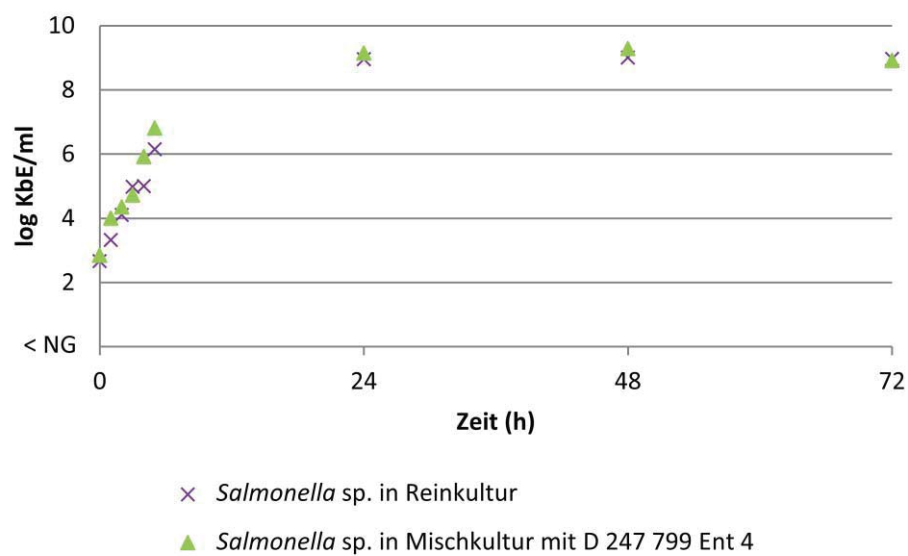


Abbildung 80: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 (10²+10² KbE/ml)

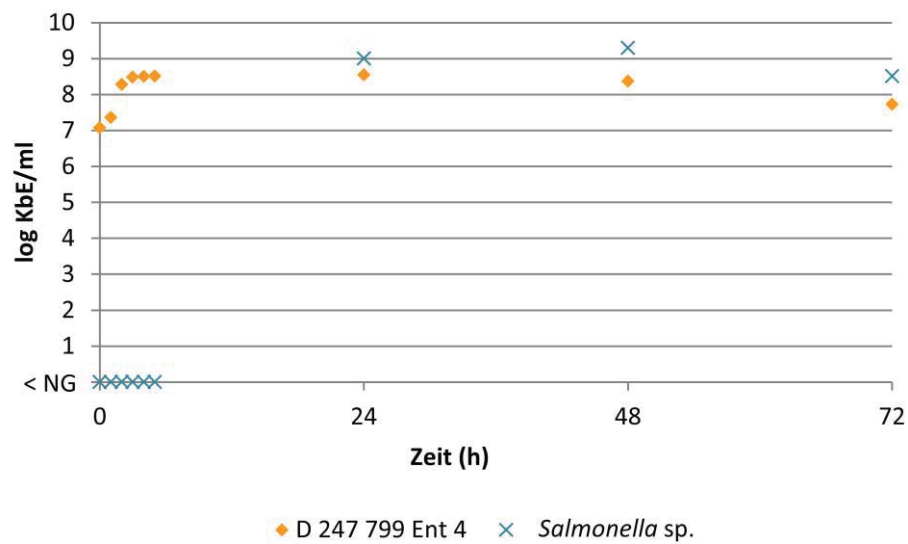


Abbildung 81: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 und *Salmonella* spp. in Mischkultur ($10^6 + 10^2$ KbE/ml)

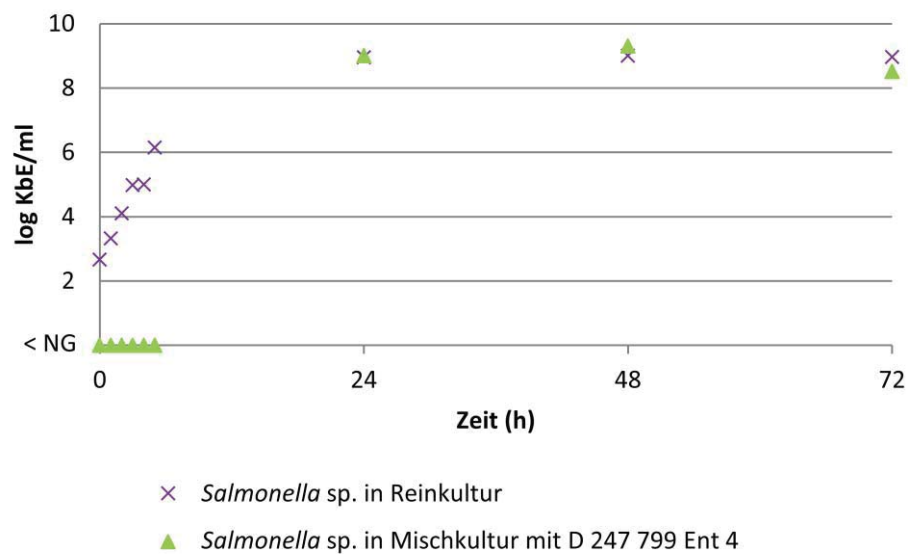


Abbildung 82: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 ($10^6 + 10^2$ KbE/ml)

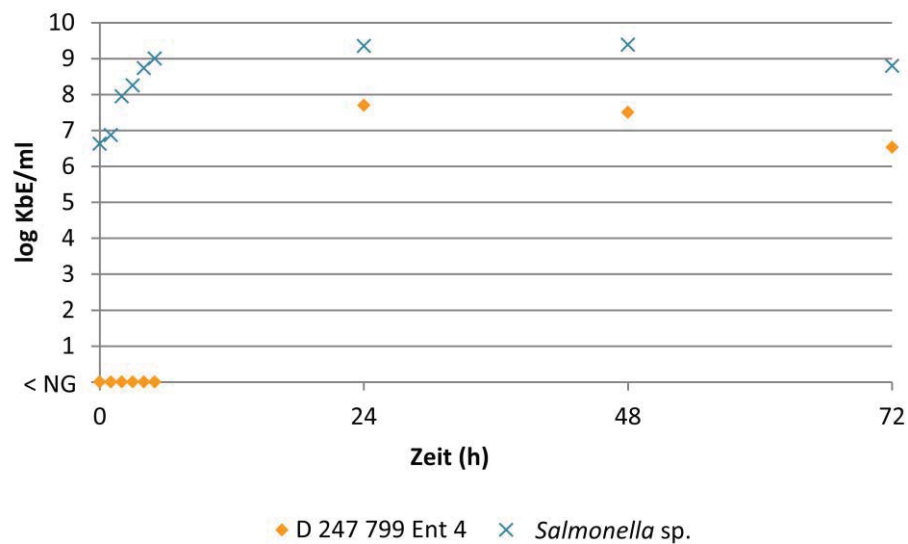


Abbildung 83: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 und *Salmonella* spp. in Mischkultur ($10^2 + 10^6$ KbE/ml)

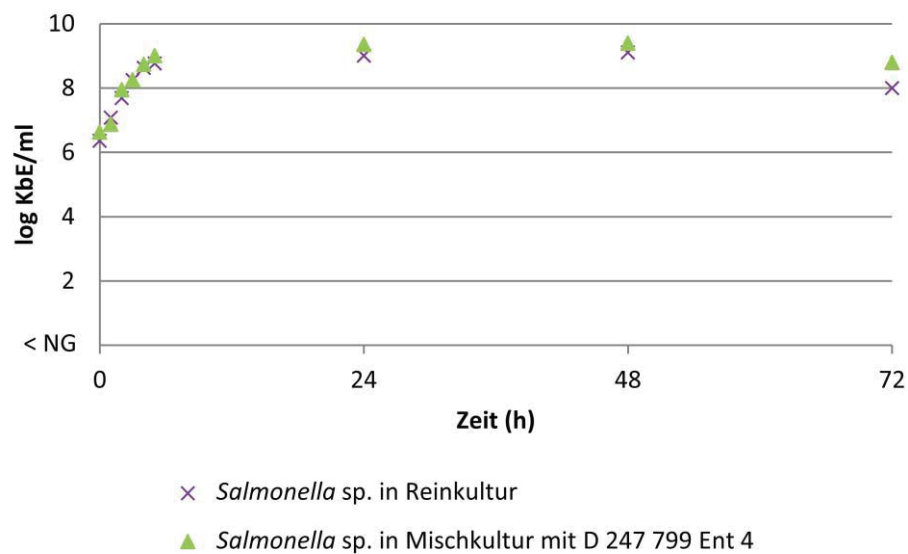


Abbildung 84: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 799 Ent4 ($10^2 + 10^6$ KbE/ml)

1.3.2 *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 versus *Salmonella* spp.

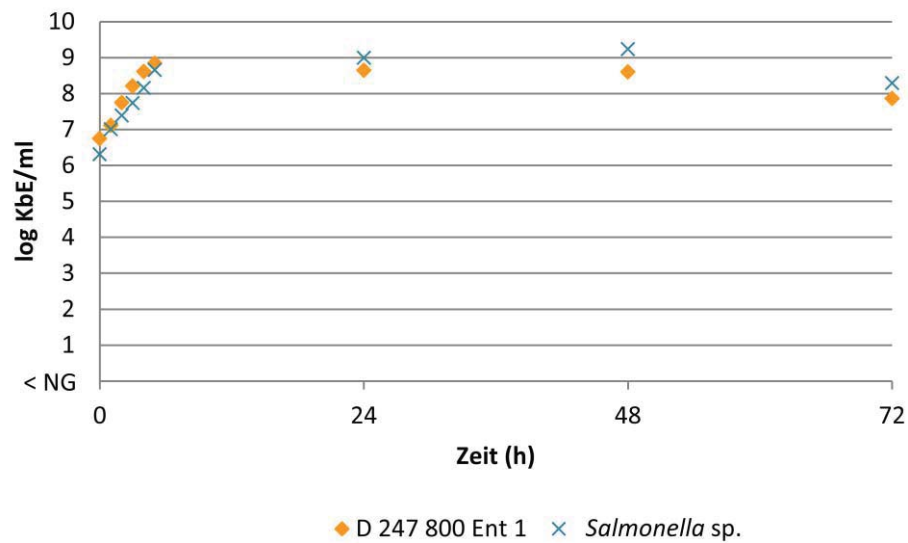


Abbildung 85: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 und *Salmonella* spp. in Mischkultur (Inokulum Testkeim vs. Indikatorkeim 10^6+10^6 KbE/ml)

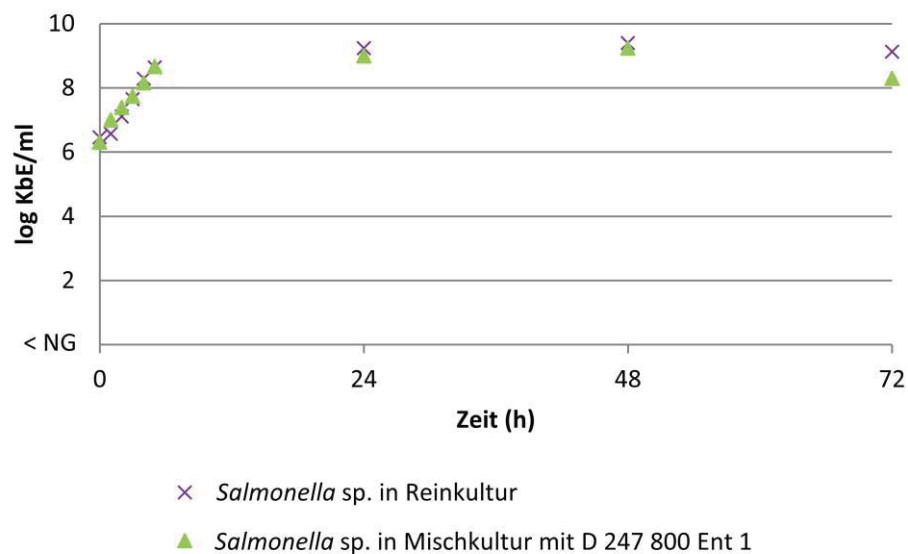


Abbildung 86: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (10^6+10^6 KbE/ml)

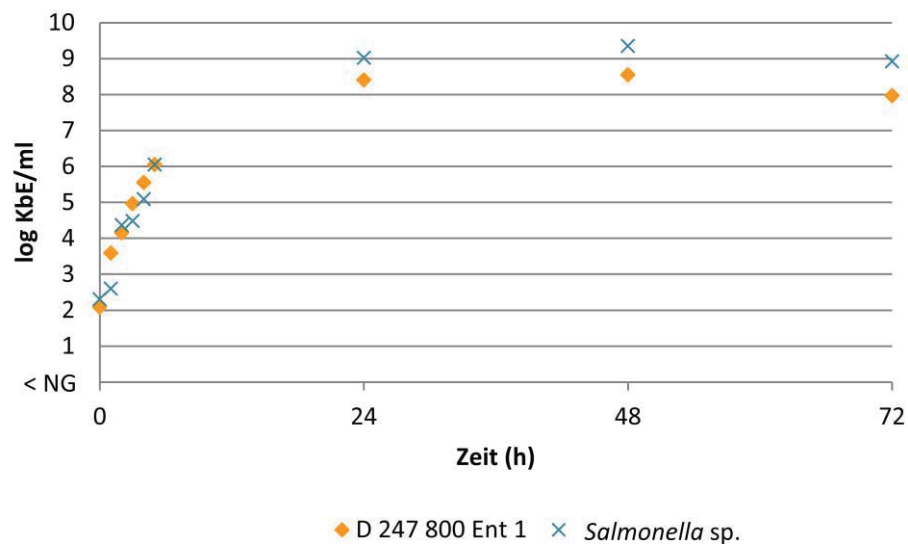


Abbildung 87: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (Testkeim) und *Salmonella* spp. (Indikatorkeim) in Mischkultur (10^2+10^2 KbE/ml)

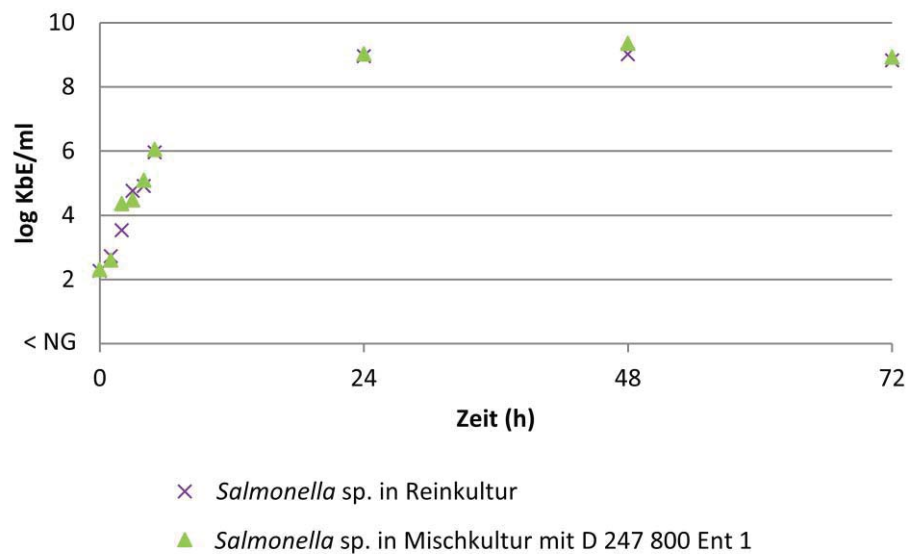


Abbildung 88: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 (10^2+10^2 KbE/ml)

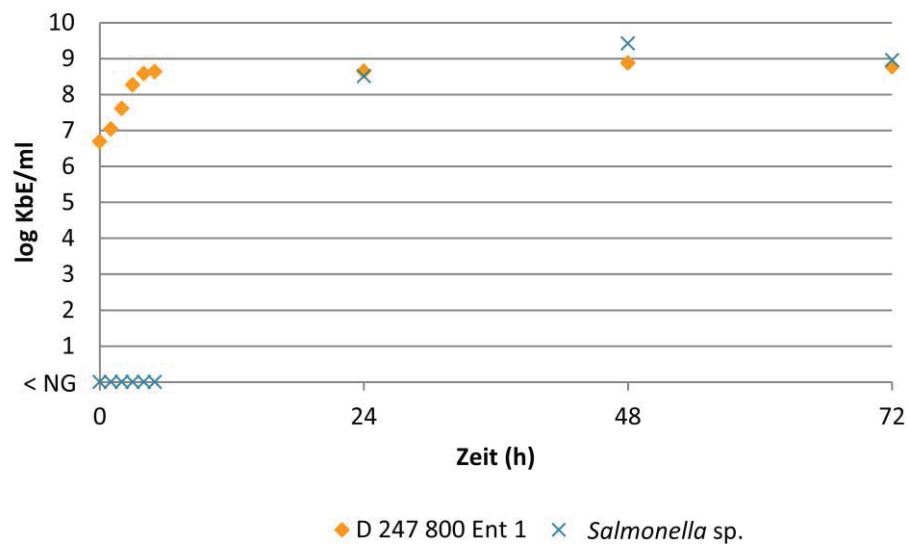


Abbildung 89: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 und *Salmonella* spp. in Mischkultur ($10^6 + 10^2$ KbE/ml)

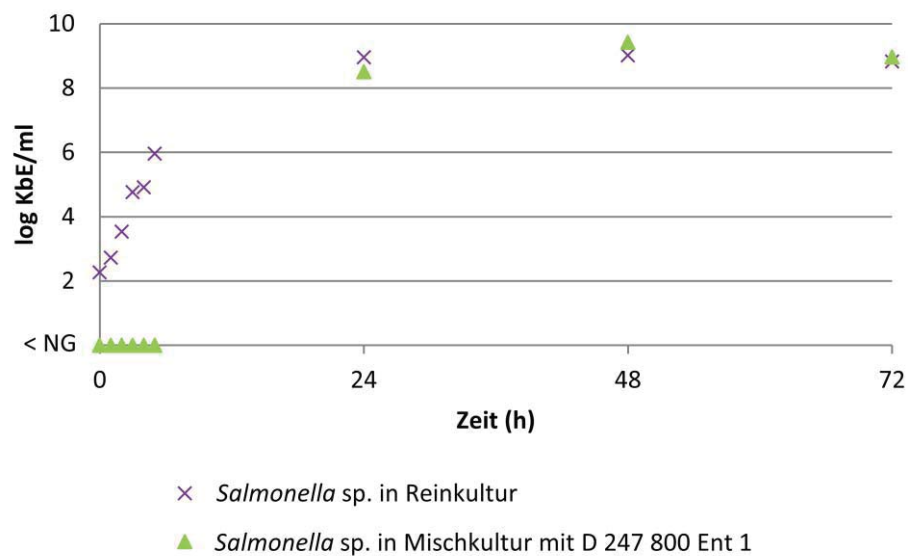


Abbildung 90: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 ($10^6 + 10^2$ KbE/ml)

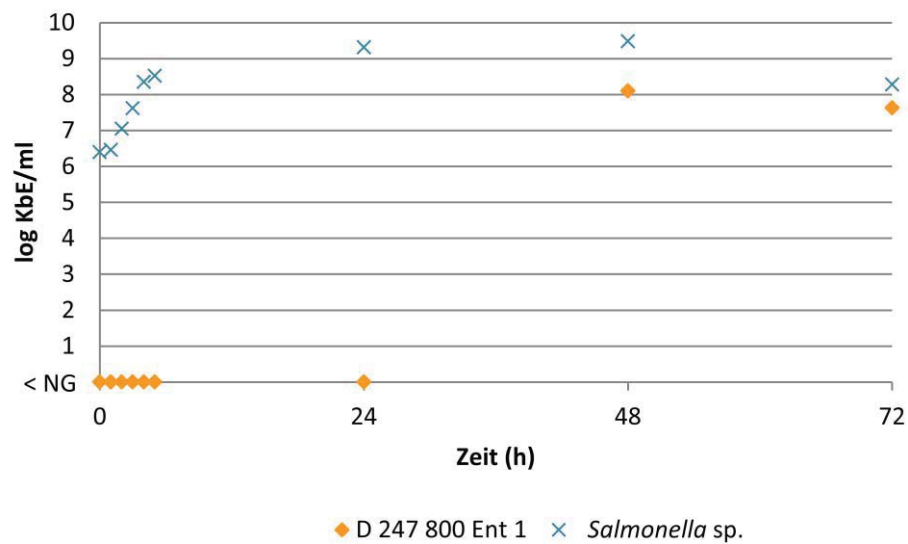


Abbildung 91: Wachstumsverlauf von *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 und *Salmonella* spp. in Mischkultur ($10^2 + 10^6$ KbE/ml)

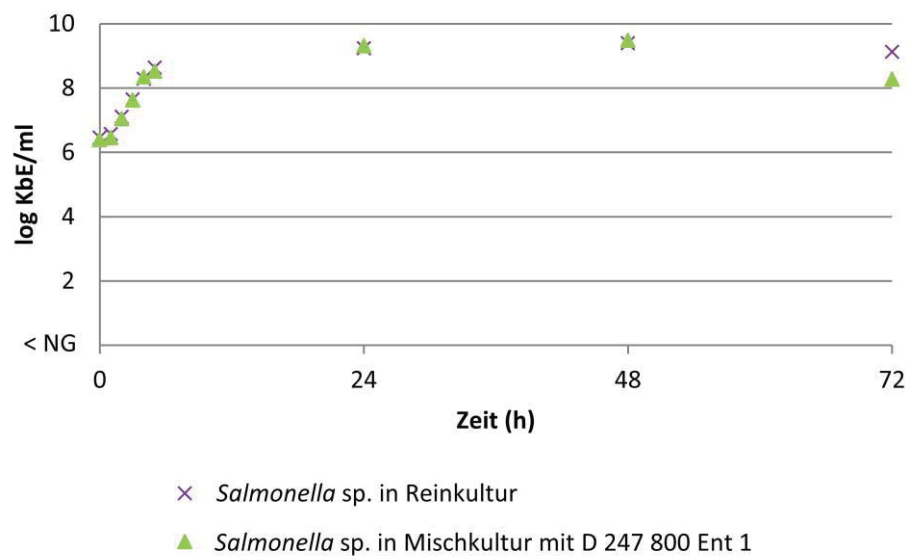


Abbildung 92: Wachstum des *Salmonella*-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit *Ent. mundtii* D 247 800 Ent1 ($10^2 + 10^6$ KbE/ml)

X ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AgNO ₂	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
AWT	Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLAST	Basic Local Alignment
bp	Basenpaare
BTK	Bundestierärztekammer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d. h.	das heißt
dest.	destilliert
DGGE	Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid

dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ds DNA	doppelsträngige DNA
DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>
ESBL	Extended-Spectrum-Betalaktamasen
et al.	und andere
EU	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GKZ	Gesamtkeimzahl
GLB	Gel-Loading-Buffer
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50
Ig	Immunglobulin
kb	Kilo-Basen
KbE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry
max.	maximal
MDE	Mutation Detection Enhancement
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
n	Anzahl
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NG	Nachweisgrenze
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p	piko
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionenkonzentration
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonucleic-acid
rpm	revolutions per minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
sp.	Species (Singular)
SPF	Specific pathogen free
spp.	Species (Plural)
ss DNA	einzelsträngige DNA
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-Puffer mit EDTA
TE	Tris-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
λ	Lambda

XI ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Überblick über den Versuchsaufbau.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 2: Überblick über den Untersuchungsgang zur Entwicklung des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Volierenhaltung, Käfighaltung und Maststallhaltung</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 3: Vorgehen zur Auswahl potentieller Inokulumstämme</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 4: Ablauf der DNA-Extraktion mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 5: Ablauf der DNA-Extraktion mittels DNeasy® Blood & Tissue Kit.</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 6: Ablauf der DNA-Extraktion mit CTAB (nach Korthals et al., 2008a; mit Modifikationen).....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 7: Ablauf der Aufreinigung von PCR-Produkten mittels GenElute™ PCR Clean-up Kit</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 8: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt).....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 9: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt).....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 10: Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt).....</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 11: Anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 12: Enterobacteriaceae-Konzentration im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt).....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 13: Enterobacteriaceae-Konzentration assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt).....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 14: Lactobacillus spp.-Keimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 15: Lactobacillus spp.-Keimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt).....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 16: Enterococcus spp.-Keimzahl im zäkalen Darminhalt von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt)</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 17: Enterococcus spp.-Keimzahl assoziiert zur zäkalen Mukosa von Küken aus Volieren- und Käfighaltung (je n = 3 pro Zeitpunkt).....</i>	<i>88</i>

<i>Abbildung 18: Resistenzraten von E. coli-Isolaten aus dem Zäkum von Küken aus Volierenhaltung zu den Probennahmezeitpunkten ≤ 24 Stunden und > 24 Stunden ≤ 7 Tage</i>	99
<i>Abbildung 19: Resistenzraten von E. coli-Isolaten aus dem Zäkum von Küken aus Käfighaltung zu den Probennahmezeitpunkten ≤ 24 Stunden und > 24 Stunden ≤ 7 Tage</i>	100
<i>Abbildung 20: Resistenzraten von E. coli-Isolaten aus dem Zäkum von Küken aus Maststallhaltung zu den Probennahmezeitpunkten ≤ 24 Stunden und > 24 Stunden ≤ 7 Tage</i>	101
<i>Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Ent. faecalis-Isolaten (n = 19) aus Zäkumproben von Küken aus Volierenhaltung (≤ 7 Tage)</i>	102
<i>Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Ent. faecium-Isolaten (n = 21) aus Zäkumproben von Küken aus Volierenhaltung (≤ 7 Tage)</i>	103
<i>Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Ent. faecalis-Isolaten (n = 23) aus Zäkumproben von Küken aus Maststallhaltung (≤ 7 Tage)</i>	104
<i>Abbildung 24: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Ent. faecium-Isolaten (n = 24) aus Zäkumproben von Küken aus Maststallhaltung</i>	105
<i>Abbildung 25: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 24 h (T 21 K-T 23 K) und 48 h (T 29 K-T 31 K)</i>	107
<i>Abbildung 26: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 72 h (T 37 K-T 39 K) und 7 Tage (T 45 K-T 47 K)</i>	108
<i>Abbildung 27: SSCP-Analyse des Mukosa-asoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 D-T 3 D) und 6 h (T 5 D-T 7 D)</i>	110
<i>Abbildung 28: SSCP-Analyse des Mukosa-asoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 13 D-T 15 D) und 24 h (T 21 D-T 23 D)</i>	111
<i>Abbildung 29: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 29 D-T 31 D) und 72 h (T 37 D-T 39 D)</i>	112
<i>Abbildung 30: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage (T 45 D-T 47 D)</i>	113
<i>Abbildung 31: SSCP-Analyse der Einstreu (Volierenhaltung)</i>	114
<i>Abbildung 32: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 72 h (T 41 K-T 43 K) und 7 Tage (T 49 K-T 51 K)</i>	115

<i>Abbildung 33: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 33 D-T35 D) und 72 h (T 41 D-T 43 D)</i>	116
<i>Abbildung 34: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 0 h (H 1 K-H 6 K) und 24 h (H 7 K-H 12 K) der Probennahme</i>	117
<i>Abbildung 35: SSCP-Analyse des zäkalen Darmmikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 48 h (H 13 K-H 18 K) und 7 Tage (H 19 K-H 24 K) der Probennahme</i>	118
<i>Abbildung 36: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 0 h (H 1 D-H 6 D) und 24 h (H 7 D-H 12 D) der Probennahme</i>	119
<i>Abbildung 37: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 48 h (H 13 D-H 18 D) und 7 Tage (H 19 D-H 24 D) der Probennahme</i>	120
<i>Abbildung 38: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Tieren aus Maststallhaltung zum den Zeitpunkt 35 Tage (H 43 D-H 48 D)</i>	122
<i>Abbildung 39: UPGMA-Analyse der Ähnlichkeit (%) der PCR-SSCP-Bandenmuster von Küken aus Volierenhaltung (T grün), Küken aus Maststallhaltung (H rot) sowie Küken aus Käfighaltung (T blau) am siebten Lebenstag. K = Proben des Blindarminhalts, D = zäkale Mukosaproben</i>	123
<i>Abbildung 40: UPGMA-Analyse der Ähnlichkeit (%) der PCR-SSCP-Bandenmuster von Tieren aus Maststallhaltung aus den Stallabteilen 1, 2 und 3 an Tag 21 der Probennahme</i>	124
<i>Abbildung 41: SSCP-Analyse des Mikrobioms der Kloake von Schneehühnern (1)</i>	125
<i>Abbildung 42: SSCP-Analyse des Mikrobioms der Kloake von Schneehühnern (2)</i>	126
<i>Abbildung 43: Beeinflussung der MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen durch Kulturüberstände des Ent.mundtii-Isolates D 247 800 Ent1</i>	127
<i>Abbildung 44: Beeinflussung der MTT-Spaltungsaktivität von Verozellen durch Kulturüberstände des Ent.mundtii-Isolates D 247 799 Ent4</i>	128
<i>Abbildung 45: RAPD-PCR-Amplifikate von Enterococcus mundtii-Isolaten aus Kloakentupferproben vom Wildvogel dargestellt durch 1 %iges Agarosegel (links Protokoll 1, rechts Protokoll 2)</i>	129

<i>Abbildung 46: RAPD-PCR-Amplifikate von Enterococcus faecium-Isolaten aus Kloakentupferproben vom Wildvogel dargestellt durch 1 %iges Agarosegel (links Protokoll 1, rechts Protokoll 2)</i>	<i>130</i>
<i>Abbildung 47: Wachstum von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (Testkeim) und E. coli (Indexkeim) in Mischkultur (Inokulum Testkeim + Indexkeim 10^6+10^6 KbE/ml)</i>	<i>131</i>
<i>Abbildung 48: Wachstum des E. coli-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^6+10^6 KbE/ml).</i>	<i>131</i>
<i>Abbildung 49: Wachstum von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 und E. coli in Mischkultur (10^2+10^2 KbE/ml).....</i>	<i>132</i>
<i>Abbildung 50: Wachstum des E. coli-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^2+10^2 KbE/ml).</i>	<i>132</i>
<i>Abbildung 51: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 und E. coli in Mischkultur (10^6+10^2 KbE/ml).....</i>	<i>133</i>
<i>Abbildung 52: Wachstum des E. coli-Isolats in Reinkultur (10^2 KbE/ml) gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^6+10^2 KbE/ml).....</i>	<i>133</i>
<i>Abbildung 53: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 und E. coli in Mischkultur (10^2+10^6 KbE/ml).....</i>	<i>134</i>
<i>Abbildung 54: Wachstum des E. coli-Isolats in Reinkultur (10^6 KbE/ml) gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^2+10^6 KbE/ml).....</i>	<i>134</i>
<i>Abbildung 55: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (Testkeim) und E. coli (Indexkeim) in Mischkultur (Inokulum Testkeim + Indexkeim 10^6+10^6 KbE/ml).....</i>	<i>135</i>
<i>Abbildung 56: Wachstum des E. coli-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (10^6+10^6 KbE /ml)</i>	<i>135</i>
<i>Abbildung 57: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 800 Ent1 und E. coli in Mischkultur (10^2+10^2 KbE/ml).....</i>	<i>136</i>
<i>Abbildung 58: Wachstum des E. coli-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (10^2+10^2 KbE/ml).</i>	<i>136</i>
<i>Abbildung 59: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 800 Ent1 und E. coli in Mischkultur (10^6+12^2 KbE/ml).....</i>	<i>137</i>
<i>Abbildung 60: Wachstum des E. coli-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (10^6+10^2 KbE/ml).</i>	<i>137</i>

Abbildung 61: Wachstumsverlauf von <i>Ent. mundtii</i> D 247 800 Ent1 und <i>E. coli</i> in Mischkultur ($10^2 + 10^6$ KbE/ml).....	138
Abbildung 62: Wachstum des <i>E. coli</i> -Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit <i>Ent. mundtii</i> D 247 800 Ent1 ($10^2 + 10^6$ KbE/ml)	138
Abbildung 63: Wachstum von <i>E. coli</i> -Isolaten ($n = 34$) von Küken aus Maststallhaltung (≤ 24 h) in Reinkultur gegenüber ihrem Wachstum in Mischkultur mit <i>Ent. mundtii</i> D 247 800 Ent1 ($10^6 + 10^6$ KbE/ml).....	139
Abbildung 64: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 K–T 3 K) und 6 h (T 5 K–T 7 K).....	192
Abbildung 65: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 9 K–T 11 K) und 24 h (T 21 D–T 23 D)	193
Abbildung 66: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Küken aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 29 D–T 31 D) und 72 h (T 37 D–T 39 D)	193
Abbildung 67: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 K–T 3 K) und 6 h (T 9 K–T 11 K)	194
Abbildung 68: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 17 K–T 19 K) und 24 h (T 26 K–T 27 K)	194
Abbildung 69: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 48 h (T 33 K–T 35 K).....	195
Abbildung 70: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 0 h (T 1 D–T 3 D) und 6 h (T 9 D–T 11 D).....	195
Abbildung 71: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 12 h (T 17 D–T 19 D) und 24 h (T 25 D–T 27 D)	196
Abbildung 72: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Küken aus Käfighaltung zum Zeitpunkt 7 Tage (T 49 D–T 51 D).....	196
Abbildung 73: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 21 Tage Stallabteil 1 (H 25 K–H 30 K) und Stallabteil 2 (H 31 K–H 36 K).....	197
Abbildung 74: SSCP-Analyse des zäkalen Mikrobioms von Küken aus Maststallhaltung zu den Zeitpunkten 21 Tage (Stallabteil 3; H 37 K–H 42 K) und 35 Tage (Stallabteil 1; H 43 K–H 48 K) der Probennahme.....	197

<i>Abbildung 75: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Küken aus Maststallhaltung aus Stallabteil 1 (H 25 D-H 30 D) und Stallabteil 2 (H 31 D-H 36 D) zum Zeitpunkt 21 Tage.....</i>	<i>198</i>
<i>Abbildung 76: SSCP-Analyse des Mukosa-assoziierten Mikrobioms von Küken aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 21 Tage (Stallabteil 3; H 37 D-H 42 D)....</i>	<i>198</i>
<i>Abbildung 77: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (Testkeim) und Salmonella spp. (Indikatorkeim) in Mischkultur (Inokulum Testkeim vs. Indikatorkeim 10^6+10^6 KbE/ml)</i>	<i>206</i>
<i>Abbildung 78: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^6+10^6 KbE/ml).</i>	<i>206</i>
<i>Abbildung 79: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 und Salmonella spp. in Mischkultur (10^2+10^2 KbE/ml)</i>	<i>207</i>
<i>Abbildung 80: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^2+10^2 KbE/ml).</i>	<i>207</i>
<i>Abbildung 81: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 und Salmonella spp. in Mischkultur (10^6+10^2 KbE/ml)</i>	<i>208</i>
<i>Abbildung 82: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^6+10^2 KbE/ml).</i>	<i>208</i>
<i>Abbildung 83: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 799 Ent4 und Salmonella spp. in Mischkultur (10^2+10^6 KbE/ml)</i>	<i>209</i>
<i>Abbildung 84: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 799 Ent4 (10^2+10^6 KbE/ml).</i>	<i>209</i>
<i>Abbildung 85: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 800 Ent1 und Salmonella spp. in Mischkultur (Inokulum Testkeim vs. Indikatorkeim 10^6+10^6 KbE/ml).....</i>	<i>210</i>
<i>Abbildung 86: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent.mundtii D 247 800 Ent1 (10^6+10^6 KbE/ml) ..</i>	<i>210</i>
<i>Abbildung 87: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (Testkeim) und Salmonella spp. (Indikatorkeim) in Mischkultur (10^2+10^2 KbE/ml)</i>	<i>211</i>
<i>Abbildung 88: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (10^2+10^2 KbE/ml)</i>	<i>211</i>
<i>Abbildung 89: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 800 Ent1 und Salmonella spp. in Mischkultur (10^6+10^2 KbE/ml).....</i>	<i>212</i>
<i>Abbildung 90: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (10^6+10^2 KbE/ml).</i>	<i>212</i>

<i>Abbildung 91: Wachstumsverlauf von Ent. mundtii D 247 800 Ent1 und Salmonella spp. in Mischkultur (10^2+10^6 KbE/ml).....</i>	<i>213</i>
<i>Abbildung 92: Wachstum des Salmonella-Isolats in Reinkultur gegenüber seinem Wachstum in Mischkultur mit Ent. mundtii D 247 800 Ent1 (10^2+10^6 KbE/ml).213</i>	

XII TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Dominierende Arten im Gastrointestinaltrakt des Huhnes (Stanley, 2014).....</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2: Probennahme-Schema und Zuordnung der Tiere (T1 – T51) zu den Versuchsgruppen</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 3: Anzuchtmedien zur bakteriologischen Untersuchung sowie ausplattierte Verdünnungsstufen je Nährboden</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 4: Differenzierung der einzelnen Keimgruppen.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 5: Reagenzien für den PCR-Ansatz der „Com-PCR“</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 6: Thermocyclerprogramm für die „Com-PCR“.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 7: Reagenzien für den Lambda-Exonukleaseverdau</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 8: Reagenzien für den PCR-Ansatz der RAPD-PCR</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 9: Thermocyclerprogramm für die RAPD-PCR (Protokoll 1).....</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 10: Thermocyclerprogramm für die RAPD-PCR (Protokoll 2).....</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 11: Für Bruteier (Volieren- und Käfighaltung) auf entsprechenden Nährmedien ermittelte Keimzahlen (KbE/g Eischale).....</i>	<i>91</i>
<i>Tabelle 12: Für Einstreu mit Dung von Althennen (Volierenhaltung) auf entsprechenden Nährmedien ermittelte Keimzahlen (KbE/g Einstreu).....</i>	<i>91</i>
<i>Tabelle 13: Für Futterproben und Trinkwasser (Maststallhaltung) auf entsprechenden Nährmedien ermittelte Keimzahlen (KbE/g bzw. KbE/ml).....</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 14: Mittels MALDI-TOF-MS identifizierte Darmmikrobiota bei Hühnern (≤ 7 Tage) in unterschiedlichen Haltungsbedingungen.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabelle 15: Nachweis von Lactobacillus spp. bei Tieren in unterschiedlichen Haltungssystemen</i>	<i>95</i>
<i>Tabelle 16: Keimnachweis aus Tupfern vom Schneehuhn (Finnland)</i>	<i>97</i>
<i>Tabelle 17: Zäkales Darmmikrobiom von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden.....</i>	<i>109</i>
<i>Tabelle 18: Mukosa-assoziierte Mikrobiota von Tieren aus Volierenhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden.....</i>	<i>113</i>
<i>Tabelle 19: Zäkales Darmmikrobiom von Tieren aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel.....</i>	<i>118</i>

<i>Tabelle 20: Mukosa-assoziierte Mikrobiota von Tieren aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 7 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel.....</i>	<i>121</i>
<i>Tabelle 21: Mukosaproben von Tieren aus Maststallhaltung zum Zeitpunkt 35 Tage: Ergebnisse der Sequenzanalyse.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabelle 22: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel von Kloakentupferproben von Wildvögeln (1).....</i>	<i>125</i>
<i>Tabelle 23: Ergebnisse der Sequenzanalyse dominanter Banden im SSCP-Gel von Kloakentupferproben von Wildvögeln (2).....</i>	<i>126</i>
<i>Tabelle 24: IC50-Werte der Kulturüberstände von Enterococcus mundtii-Isolaten aus Wildvogelproben (Schneehuhn, Finnland).....</i>	<i>128</i>
<i>Tabelle 25: IC50-Werte der Kulturüberstände von Enterococcus faecium-Isolaten aus Wildvogelproben (Schneehuhn, Finnland).....</i>	<i>129</i>
<i>Tabelle 26: Zäkales Mikrobiom von Tieren aus Volierenhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse (Tag 7)</i>	<i>199</i>
<i>Tabelle 27: Mukosa-assoziiertes Mikrobiom von Tieren aus Volierenhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse (Tag 7).....</i>	<i>200</i>
<i>Tabelle 28: Zäkales Mikrobiom von Tieren aus Maststallhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse</i>	<i>201</i>
<i>Tabelle 29: Mukosa-assoziiertes Mikrobiom von Tieren aus Maststallhaltung: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse</i>	<i>202</i>
<i>Tabelle 30: Mikrobiom der Kloake vom Schneehuhn: Sequenzen dominanter Banden der SSCP-Analyse.....</i>	<i>203</i>

XIII DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers und Herrn Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner für die Überlassung des interessanten Themas meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer danke ich von ganzem Herzen für seine konstruktiven Hilfestellungen und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Lehrstuhl für Tierhygiene der TU München in Weihenstephan.

Mein großer Dank geht an Frau Dr. Christina Hölzel für die Bereitschaft, mich als Doktorandin zu betreuen, außerdem für ihre hervorragende fachliche Unterstützung und die große Sorgfalt bei der Durchsicht meiner Arbeit. Besonders herzlich danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und ihre Empathie.

Herrn Dr. Josef Bachmeier und den Mitarbeitern der Brüterei Süd danke ich für ihre Unterstützung bei der Probennahme im Rahmen unseres Projekts.

Danke an Herrn Dr. Osmo Rätti vom Arctic Centre, University of Lapland für seine Hilfe bei der Probenbeschaffung aus Finnland.

Frau Sarah Lettmann danke ich für die schöne Zusammenarbeit innerhalb des gemeinsamen Projekts.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Cengiz Dedeoglu für seine Kollegialität und die Hilfe bei meinen MALDI-TOF-MS Messungen.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierhygiene bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders möchte ich Frau Barbara Fritz, Frau Andrea Klaus und Frau Yuleisy Whilby für ihre hervorragende Arbeit und die schönen gemeinsamen Stunden im Labor danken.

Danke an meine Familie:

An meine Eltern Frau Angelika und Dr. Michael Boss, für Eure Liebe. Danke, dass Ihr in jeglichen Höhen und Tiefen meines Lebens immer fest an meiner Seite steht und immer für mich da seid.

An meine Schwester Vanessa Boss, weil sie die Beste ist.

Thomas Grün, ich hab Dich lieb und bin sehr glücklich, dass es Dich gibt.